



**Crisolita de Fátima Fortes Pires**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Física

## **Desenvolvimento de uma Língua Eletrónica para avaliar a qualidade de azeite**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Mestrado Integrado em Engenharia Física

Orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima G. S. C. Raposo, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Isabel Simões Catarino

Arguentes: Prof. Doutora Maria Madalena A. C. S. D. Andrade

Vogais: Prof. Doutora Maria de Fátima G. S. C. Raposo



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Junho de 2016**









**Crisolita de Fátima Fortes Pires**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Física

## **Desenvolvimento de uma Língua Eletrónica para avaliar a qualidade de azeite**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Mestrado Integrado em Engenharia Física

Orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima G. S. C. Raposo, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Isabel Simões Catarino

Arguentes: Prof. Doutora Maria Madalena A. C. S. D. Andrade

Vogais: Prof. Doutora Maria de Fátima G. S. C. Raposo



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Junho de 2016**



## **Desenvolvimento de uma Língua Eletrónica para avaliar a qualidade de azeite**

Copyright©2016 – Todos os direitos reservados. Crisolita de Fátima Fortes Pires. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

*Isaac Newton*



*Aos meus pais, Joana Fortes e António Pires*

*À minha irmã, Elisângela Pires*



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Maria de Fátima G. S. C. Raposo, orientadora científica desta tese, agradeço todo o apoio prestado, os conhecimentos científicos transmitidos, a disponibilidade e, principalmente, a paciência, a amizade e o incentivo demonstrados ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Doutor Paulo Ribeiro pelas sugestões úteis no laboratório, disponibilidade e pela boa disposição.

À Professora Doutora Susana Sérgio, pela disponibilização do espectrofotómetro de UV-Vis.

Ao Professor Doutor Marco Gomes Silva e ao Davide Mendes do Departamento de Química agradeço o contributo não só por terem cedido o cromatógrafo para algumas medições, como também pelo apoio nas análises de cromatografia em fase gasosa.

Aos colegas de laboratório, em particular o Ivan Assunção e a Analissa Duarte pelo excelente ambiente de trabalho, entreaajuda, animação e constante incentivo.

À minha família, em particular à minha mãe Joana, ao meu pai António e a minha irmã Elisângela que mesmo estando longe apoiaram-me constantemente, principalmente, em muitos momentos menos bons. Obrigada pelos conselhos, pela educação e pelo amor.

Aos meus amigos, pelo carinho, incentivo e apoio durante a minha permanência em Portugal e, principalmente, ao longo do desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada por tudo.



O azeite virgem extra (AVE) desempenha um papel fundamental como a principal fonte de gordura na dieta mediterrânica que tem sido tradicionalmente relacionada com a longevidade das populações do Mediterrâneo e está associado a uma melhoria significativa na saúde por contribuir para a redução da mortalidade causada por várias doenças crónicas. Como o AVE é considerado um produto de qualidade superior está suscetível a fraude económica, havendo necessidade de investigar alternativas que possam detetar anomalias neste produto. Com o objetivo de se encontrar melhores formas de se verificar a qualidade de azeite, no presente trabalho foi projetada e desenvolvida uma língua eletrónica (LE) baseada em espectroscopia de impedância que visa caracterizar a impedância elétrica de diferentes tipos de azeite e de misturas de AVE com os óleos de amendoim e girassol. Para caracterizar as amostras de azeite foram utilizados sensores compostos por elétrodos interdigitados de ouro depositados sobre um suporte de vidro comum. A fim de melhorar a sensibilidade, em alguns sensores, foram depositados pela técnica camada-sobre-camada (LbL, do inglês, *Layer-by-Layer*) filmes finos baseados nos polieletrólitos, poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH), poli(1-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo)-benzenesulfonamida)-1,2-etanodiol), sal de sódio) (PAZO) e óxido de grafeno (GO, do inglês, *graphene oxide*). A caracterização das variedades de azeite e de azeite adulterado, com e sem filmes finos, foi realizada imergindo os sensores nas amostras e medindo a impedância em função da frequência do sinal de entrada. Esta medição consiste na recolha da capacidade e da resistência elétrica com recurso ao analisador *HAMEG Programmable LCR Bridge*, modelo *HM8118* na gama de frequência compreendida entre 20 Hz e 200 KHz. Os resultados obtidos foram sujeitos ao tratamento estatístico utilizando a técnica de análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), que permitiu também caracterizar as diferentes amostras com base nos resultados originais de capacidade e de resistência elétrica. Através dos resultados obtidos foi possível classificar os diferentes tipos de azeite e discriminar o AVE adulterado, permitindo assim concluir que o protótipo de língua eletrónica desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta complementar na análise de azeite.

**Palavras-chave:** Língua eletrónica, espectroscopia de impedância, azeite, sensor interdigitado, adulteração, classificação.

---





The extra virgin olive oil (EVOO) has a fundamental role as the main source of fat in the Mediterranean diet which has been and it has been traditionally associated to longevity of the Mediterranean people and is related with a significant improvement in the health, on reducing mortality in several chronic diseases. As the EVOO is considered a top quality product, the susceptibility to economic fraud increases and there is a need for research on options that detect anomalies on this product. In order to find better ways to verify the quality of the olive oil, in this work was designed and developed an electronic tongue (ET) based on impedance spectroscopy which aims to characterize the electrical impedance of different types of olive oil and mixes of EVOO with peanut and sunflower oils. To characterize the olive oil samples an array of glass solid supports with deposit interdigitated gold electrode were used as sensors. In some of solid support thin layers of polyelectrolytes, poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly(1-(4-(3-carboxy-4-hydroxyphenylazo)-benzene sulfonamide)-1,2-ethanediyl), sodium salt) (PAZO) and graphene oxide (GO) were deposited by layer-by-layer (LbL) technique to improve the sensibility. The characterization of varieties of olive oil and olive oil adulterated with and without thin films was carried out by immersing the sensors in the sample and measuring the impedance as a function of the frequency input signal. The impedance measurement consisted in the collection of capacity and electrical resistance using a HAMEG Programmable LCR Bridge analyzer, HM8118 model, in the frequency range between 20 Hz and 200 KHz. The results were subjected to statistical analysis using the principal components analysis technique (PCA) which also allowed to characterize the different samples based on the original results of capacity and electrical resistance. With the results obtained, it was possible to classify the different types of olive oil and discriminate EVOO adulterated, thus completing the ET prototype can be used as a complementary tool in olive oil analysis.

**Keywords:** Electronic tongue, impedance spectroscopy, olive oil, interdigitated sensor, adulteration, classification

---



## Índice de Matérias

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Conceitos Teóricos .....</b>	<b>5</b>
2.1	A origem e o cultivo da oliveira .....	5
2.1.1	Maturação do fruto da oliveira .....	6
2.2	Azeite .....	7
2.2.1	Processo de extração do azeite .....	7
2.2.2	Denominação dos diferentes tipos de azeite .....	8
2.2.3	Composição química do azeite .....	10
2.2.4	Fatores que influenciam a qualidade de azeite .....	12
2.2.5	Adulteração de azeite .....	13
2.3	Língua eletrônica aplicada na análise de líquidos .....	13
2.3.1	Princípio de detecção e aplicações de línguas eletrônicas .....	15
2.3.2	Princípio de funcionamento de sensores interdigitados capacitivos .....	15
2.4	Espetroscopia de impedância .....	17
2.4.1	Definição de impedância .....	17
2.4.2	Circuito equivalente: resistência e condensador em paralelo .....	19
2.5	Análise de Componentes Principais .....	22
<b>3</b>	<b>Amostras e Métodos Experimentais .....</b>	<b>25</b>
3.1	Amostras de azeite e óleo vegetal .....	25
3.2	Sensores .....	28
3.2.1	Caraterísticas dos sensores interdigitados de ouro .....	28
3.2.2	Materiais para a produção de camadas sensoriais .....	30
3.2.2.1	Preparação de soluções e construção de filmes finos .....	31
3.3	Técnicas de caracterização das amostras .....	33
3.3.1	Espetrofotometria de Ultravioleta-Visível.....	33
3.3.2	Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa .....	34
3.3.3	Espetroscopia de impedância.....	37
3.3.3.1	Composição da língua eletrônica .....	37
3.3.3.2	Automatização do sistema de aquisição de dados.....	38
3.4	Análise estatística.....	39
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>41</b>
4.1	Caraterização de azeites .....	41
4.1.1	Espetrofotometria de Ultravioleta-Visível.....	41
4.1.2	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa .....	44
4.2	Análise da reprodutibilidade do sensor sem camada sensorial.....	51
4.2.1	Análise em amostras de GLSUVE .....	51
4.2.2	Análise em amostras de GLCLVE .....	52

4.3	Caraterização de OLSVE exposto a temperatura controlada e luz ambiente.....	54
4.3.1	Efeito da temperatura controlada nas medições de impedância.....	54
4.3.2	Efeito da luz e temperatura ambiente por UV-Vis.....	55
4.3.3	Efeito da luz e temperatura ambiente nas medições de impedância .....	56
4.4	Classificação de azeites .....	57
4.4.1	Análise por espectroscopia de impedância .....	57
4.4.2	Extração de variáveis para análise em PCA.....	59
4.4.3	Análise pelo método PCA .....	60
4.5	Discriminação de AVE adulterado com óleos alimentares.....	61
4.5.1	Análise de OLSVE adulterado com OLFPFA .....	62
4.5.1.1	Análise com o sensor sem camada sensorial .....	62
4.5.1.2	Análise com o sensor com camada sensorial (PAH/PAZO) <sub>5</sub> .....	65
4.5.1.3	Análise com o sensor com camada sensorial (PAH/GO) <sub>5</sub> .....	67
4.5.1.4	Análise pelo método PCA .....	70
4.5.2	Análise de OLSVE adulterado com OLFPG .....	71
4.5.2.1	Análise com o sensor sem camada sensorial .....	71
4.5.2.2	Análise pelo método PCA .....	74
4.5.3	Comparação de misturas .....	74
4.6	Comentário final.....	75
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>79</b>
5.1	Conclusões.....	79
5.2	Perspetivas futuras.....	80
5.3	Trabalhos no âmbito da tese .....	83
	<b>Anexos.....</b>	<b>85</b>
	<b>Bibliografia.....</b>	<b>87</b>



## Lista de Figuras

Figura 2.1: Fotografias de (a) um corte transversal de uma azeitona que mostra o seu aspeto interior com a sua constituição principal (o epicarpo, mesocarpo e o endocarpo) [15] e de (b) diferentes estágios de maturação do epicarpo [16].	6
Figura 2.2: Diagrama representativa dos diferentes processos de extração: a prensagem e o contínuo de duas e três fases com os seus respetivos subprodutos.	8
Figura 2.3: Representação esquemática das etapas de deteção e reconhecimento do sabor e da analogia existente entre uma LE e o sensor do sabor humano.	14
Figura 2.4: Ilustração da configuração geral dos elétrodos (a) e de uma corte transversal de um sensor interdigitado (b). Adaptado [39].	16
Figura 2.5: Esquema representativo do princípio de funcionamento de um sensor interdigitado capacitivo.	16
Figura 2.6: Representação da corrente $i$ através dos componentes $R$ , $L$ e $C$ em série.	17
Figura 2.7: Representação de um circuito em paralelo constituído por uma resistência ( $R$ ) e um condensador ( $C$ ) alimentados por uma fonte de tensão do tipo $v(t) = V \cos \omega t$ .	21
Figura 3.1: Fotografias das garrafas de (a) Oliveira da Serra Refinado e Virgem, Oliveira da Serra Virgem Extra, Gallo Subtil Refinado e Virgem, Gallo Suave Virgem Extra, Gallo Clássico Virgem Extra, e SOS Pobreza Refinado e Virgem da AMI e dos (b) óleos Fula Puro Amendoim e Fula Puro Girassol usados para as misturas com o AVE.	26
Figura 3.2: Fotografia do sensor interdigitado de ouro usado em (a) e de uma imagem ampliada (100x) que mostra uma região dos seus elétrodos em (b). Esta imagem é obtida através do microscópio ótico.	29
Figura 3.3: Representação esquemática do sensor interdigitado com a dimensão dos seus elétrodos.	29
Figura 3.4: Representação esquemática da estrutura molecular dos polieletrólitos (a) poli(1-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo)-benzenesulfonamida)-1,2-etanodiil, sal de sódio) (PAZO) [48], (b) poli(hidrocloreto de alimanina) (PAH) [49] e (c) óxido de grafeno (GO) [47].	31
Figura 3.5: Representação esquemática do procedimento experimental de produção de filmes finos pela técnica LbL que indica as etapas: (1) representação da adsorção de um polieletrólito catiónico no substrato (sensor interdigitado de ouro) com o tempo de imersão de 1 minuto; (2) processo de lavagem do substrato com uma camada de um polieletrólito catiónico na solução de lavagem; (3) representação da adsorção de uma camada de um polieletrólito aniónico com tempo de imersão de 1 minuto; (4) processo de lavagem da bicamada dos polieletrólitos catiónico e aniónico na solução de lavagem e (5) secagem de uma bicamada com azoto e de um substrato composto com as camadas alternadas de polímeros catiónicos e aniónicos.	33
Figura 3.6: Esquema representativo de um sistema ótico de um espectrofotómetro UV-Vis de duplo feixe.	34
Figura 3.7: Configuração básica de um instrumento GC com a sua constituição principal: cilindro de gás de arraste, forno, seringa para a injeção da amostra, coluna e detetor [51].	35
Figura 3.8: Esquema ilustrativo do sistema experimental que compreende o analisador de impedância HAMEG 8118, o sistema de aquisição de dados, o sensor interdigitado imerso numa amostra e a sonda que permite acoplar o sensor.	38

Figura 4.1: Espectros de absorção dos AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE), dos ARV (OLSRV, SOSPBRV e GLSBRV) e dos óleos (OLFPA e OLFPG) obtidos por UV-Vis na gama de comprimento de onda entre 300 nm e 700 nm. ....	42
Figura 4.2: Espectro de absorção do azeite OLSVE obtido por UV-Vis em (a), (b), (c) e (d). As linhas a vermelho, azul e verde em (a), (b), (c) e (d) correspondem ao ajuste das bandas por funções gaussianas. ....	43
Figura 4.3: Cromatogramas obtidos por GC-MS para a determinação dos compostos das amostras: OLSVE, GLSUVE e do GLCLVE. ....	45
Figura 4.4: Cromatogramas obtidos por GC-MS para a determinação dos compostos das amostras: OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPA e OLFPG. ....	47
Figura 4.5: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de duas medições de uma amostra de GLSUVE, obtidos por espectroscopia de impedância nas mesmas condições de temperatura (25 °C). ....	52
Figura 4.6: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de duas medições de uma amostra de GLCLVE obtidos por espectroscopia de impedância nas mesmas condições de temperatura (25 °C). ....	53
Figura 4.7: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE, obtidos por espectroscopia de impedância a diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C. ....	55
Figura 4.8: Espectros de absorção de OLSVE exposto a luz e temperatura ambiente obtidos por UV-Vis na gama dos 300 nm aos 700 nm. A representação gráfica inclui a curva original (amostra de azeite mantida às escuras) e de análises realizadas após 5, 12, 42 e 48 dias da exposição do OLSVE a luz e temperatura ambiente. ....	55
Figura 4.9: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE exposto durante 5, 12, 42 e 48 dias a luz e temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos por espectroscopia de impedância. ....	57
Figura 4.10: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação dos AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE) e dos ARV (OLSRV, GLSBRV e SOSPBRV), obtidos por espectroscopia de impedância. ....	58
Figura 4.11: Representações gráficas que mostram a relação entre as amostras: AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE), ARV (OLSRV, GLSBRV e SOSPBRV) e os óleos (OLFPA e OLFPG) e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam (a) 90,38% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente apenas à análise de impedância (b) 91,38% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente a adição das intensidades das bandas de absorção e (c) 82,20% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente a adição das amostras de óleo e dos compostos com características positivas ou negativas. ....	61
Figura 4.12: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de azeite OLSVE adulterado com o sensor sem camada sensorial, obtidos por espectroscopia de impedância. ....	63
Figura 4.13: Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com o OLFPA para a frequência fixa de $2 \times 10^3$ Hz. O sensor não se encontrava revestido com filmes finos. As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente, ....	64
Figura 4.14: Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE adulterado com OLFPA com o sensor revestido com camadas sensoriais de (PAH/PAZO) <sub>5</sub> , obtidos por espectroscopia de impedância. ....	66

Figura 4.15: Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPa para a frequência fixa de $2 \times 10^3$ Hz. O sensor se encontrava revestido com as combinações dos polieletrólitos (PAH/PAZO) <sub>5</sub> . As linhas a verde e a vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais e lineares da curva de capacidade e de resistência, respetivamente. ....	67
Figura 4.16: Espetros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE adulterado com OLFPa com o sensor revestido com camadas sensoriais (PAH/GO) <sub>5</sub> , obtidos por espectroscopia de impedância. ....	68
Figura 4.17: Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPa para a frequência fixa de $2 \times 10^3$ Hz. O sensor se encontrava revestido com as combinações dos polieletrólitos (PAH/GO) <sub>5</sub> . As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções lineares e exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente. ....	69
Figura 4.18: Representações gráficas que mostram a relação entre o rácio de azeite (1_A; 0,8_A; 0,6_A; 0,4_A; 0,2_A e 0_A) e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam (a) 93,17% e (b) 76,42% da variância total dos dados, respetivamente. A primeira representação gráfica refere-se ao sistema com o sensor sem adsorção de filmes e a segunda corresponde à adição das variáveis dos ensaios com o sensor revestido com as combinações de (PAH/PAZO) <sub>5</sub> e (PAH/GO) <sub>5</sub> . ....	71
Figura 4.19: Espetros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação do OLSVE adulterado com OLFPg com o sensor sem camada sensorial, obtidos por espectroscopia de impedância. ....	72
Figura 4.20: Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPg para a frequência fixa de $2 \times 10^3$ Hz. O sensor não se encontrava revestido com filmes finos. As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente. ....	73
Figura 4.21: Representação gráfica que mostra a relação entre o rácio de azeite (1_G; 0,8_G; 0,6_G; 0,4_G; 0,2_G e 0_G) e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam 96,66% da variância total dos dados. Este resultado refere-se ao ensaio de OLSVE misturado com OLFPg com o sensor sem filme. ....	74
Figura 4.22: Representação gráfica da relação entre as misturas de OLSVE com os óleos (OLFPa e OLFPg) sem adsorção de filmes finos nos eléctrodos e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam 90,29 % da variância total dos dados. ....	75





## Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Descrição das amostras de azeite com a classificação de AVE e ARV e dos óleos utilizados na preparação de misturas com o AVE. ....	26
Tabela 3.2: Propriedades físico-químicas das amostras de azeite conforme a informação fornecida no rótulo. ....	27
Tabela 3.3: Descrição das propriedades físico-químicas dos óleos vegetais, conforme a informação disponível rótulo. ....	27
Tabela 3.4: Descrição das quantidades de mistura de OLSVE com oOLFPA eOLFPG e a nomenclatura usada. ....	28
Tabela 4.1: Parâmetros dos ajustes com curvas gaussianas do espectro de absorção de OLSVE obtido por UV-Vis. ....	43
Tabela 4.2: Compostos identificados nas amostras de OLSVE, GLSUVE, GLCLVE, OLSRV, SOSPBVR, GLSBRV,OLFPA eOLFPG. Os compostos detetados e os não detetados são representados por x e 0, respetivamente. ....	47
Tabela 4.3: Variáveis selecionadas a partir dos espectros de impedância, de UV-Vis e de GC-MS para o método estatístico PCA. ....	59
Tabela 4.4: Parâmetros dos ajustes com curvas exponenciais da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado comOLFPA com o sensor sem camada sensorial. ....	64
Tabela 4.5: Parâmetros dos ajustes exponencial e linear da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado comOLFPA com o sensor revestido com (PAH/PAZO) <sub>5</sub> . ....	67
Tabela 4.6: Parâmetros dos ajustes linear e exponencial da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado comOLFPA com o sensor revestido com (PAH/GO) <sub>5</sub> . ....	70
Tabela 4.7: Parâmetros dos ajustes exponenciais da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado comOLFPG com sensor sem camada sensorial. ....	73



## Lista de Siglas e Símbolos

AC	Corrente alternada (do inglês, <i>Alternating Current</i> )
AMI	Assistência Médica Internacional
ARV	Azeite composto por azeite refinado e virgem
AVE	Azeite Virgem Extra
BK7	Vidro ótico de borosilicato
C	Condensador
CEFITEC	Centro de Física e Inovação Tecnológica
COI	Conselho Oleícola Internacional
COM	Porto de comunicação
DC	Corrente contínua (do inglês, <i>Direct Current</i> )
F	Faraday
GC-MS	Combinação das técnicas de cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (do inglês, <i>Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i> )
GLCLVE	Azeite Gallo Clássico Virgem Extra
GLSBRV	Azeite Gallo Subtil que contém azeite Refinado e Virgem
GLSUVE	Azeite Gallo Suave Virgem Extra
GO	Óxido de grafeno (do inglês, <i>Oxide Graphene</i> )
L	Bobina
LbL	Camada-sobre-camada (do inglês, <i>Layer-by-Layer</i> )
LE	Língua Eletrónica
nm	Nanómetros
OLFPA	Óleo Fula Puro Amendoim
OLFPG	Óleo Fula Puro Girassol
OLSRV	Azeite Oliveira da Serra que contém azeite Refinado e Virgem
OLSVE	Azeite Oliveira da Serra Virgem Extra
PAH	Poli(hidroclorato de alilamina)
(PAH/GO) <sub>5</sub>	Filme fino de cinco bicamadas de PAH e GO

(PAH/PAZO) <sub>n</sub>	Filme fino de n bicamadas de PAH e PAZO
PAR	Paralelo
PAZO	Poli(1-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo)-benzenesulfonamida)-1,2 etanodiil), sal de sódio
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i> )
PET	Poli(tereftalato de etileno) é um polímero termoplástico de poliéster
R	Resistência
RS232	<i>Standard</i> de comunicação em série
SOSPBRV	Azeite SOS Pobreza que contém azeite Refinado e Virgem
UE	União Europeia
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
UV-Vis	Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível
UV	Ultravioleta
Vis	Visível





## **Introdução**

Nos últimos vinte anos, o consumo de azeite sofreu um aumento significativo em todo o mundo devido às suas características organoléticas e à sua composição química, sendo esta última associada aos benefícios da saúde humana. O azeite é, maioritariamente, composto por ácidos gordos, nomeadamente, o ácido oleico que permite controlar o nível de colesterol e os ácidos linoleico e linolénico que reduzem o risco de doenças coronárias. Na constituição do azeite encontram-se também os compostos minoritários denominados compostos voláteis e compostos fenólicos que têm efeitos benéficos sobre o valor nutricional e qualidade sensorial e contribuem para as características únicas do azeite. Os primeiros são responsáveis pelo aroma, enquanto os segundos estão associados ao gosto (notas de amargo e picante), às propriedades antioxidantes, atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas [1], [2]. Na bacia do Mediterrâneo, o azeite constitui um componente importante na dieta dos indivíduos dessa região. Um estudo realizado revela que nos países, tais como a Grécia, Itália e Espanha, onde o consumo de azeite é elevado, a mortalidade por cancro da mama e colo-retal é, consideravelmente, menor do que em países onde o seu consumo é reduzido, como é o caso da Escócia, Inglaterra e Dinamarca [3].

O azeite extra virgem é uma das variedades de azeite com melhor qualificação, uma vez que é obtido recorrendo apenas às etapas de processamento mecânico ou outros meios físicos, em condições que não alterem a sua composição. Este procedimento contribui para a preservação das suas características responsáveis pelo sabor agradável e para os benefícios nutricionais, essenciais para a saúde. Isto torna o azeite extra virgem um produto de valor económico elevado e, portanto, está sujeito à adulteração com outros óleos comestíveis de menor qualidade e com valor comercial inferior. Esta prática, além de ser considerada fraude económica, pode causar implicações graves na saúde dos consumidores [4]. Embora menos frequente, o produto pode ainda de forma aciden-

tal ter uma qualidade inferior devido às práticas inadequadas de produção e de condições de armazenamento [5]. A determinação válida e precisa da composição de azeite não é apenas uma questão de estabelecer a sua superioridade em relação aos outros óleos vegetais, mas o mais importante é avaliar a sua qualidade e autenticidade. A monitorização da qualidade do azeite (a história de armazenamento, estabilidade à oxidação e o teor de lípidos) e autenticação (deteção de adulteração ou de origem da produção) constitui, atualmente, os principais desafios para a indústria do azeite. A União Europeia (UE), o Conselho Oleícola Internacional (COI) e algumas organizações nacionais estão ativamente empenhados na elaboração de políticas para regulamentar este processo. Para o efeito, já se encontram implementados alguns métodos, regras e limites de deteção para a determinação da composição e para os diversos parâmetros físico-químicos do azeite, na perspetiva de preservar a sua qualidade e autenticidade contra ações ilegais.

A abordagem comum para detetar fraudes consiste em comparar a composição química do azeite suspeito com os limites legais estabelecidos para os seus diversos componentes ou constantes físicas. Espera-se que qualquer adição adulteradora modifique a concentração dos seus componentes ou, pelo menos, indique uma anomalia na sua composição química. No entanto, depois de anos de prática, este procedimento foi considerado insuficiente para análises minuciosas de qualidade e autenticidade, especialmente em azeites virgens que podem não estar em conformidade com os limites legais em determinados constituintes devido às peculiaridades climáticas ou de solos locais. Para além disso, o método em causa é demorado e incapaz de investigar um número maior de amostras. A falsa declaração da origem geográfica, informações falsas sobre o período de colheita e a data de extração são outros aspetos fraudulentos que tornam este método ineficiente [6]. Um outro método utilizado na deteção de fraude consiste na análise sensorial que se baseia nas características organoléticas do azeite com recurso a um teste realizado por um painel de provadores treinados para reconhecer e avaliar os seus atributos sensoriais. Contudo, este método é ineficaz devido à subjetividade dos especialistas, à variabilidade das respostas ao longo do tempo, à avaliação do número de amostras por dia. Esta última é limitada e os resultados podem ser influenciados pela pressão imposta sobre os membros do painel [5].

O azeite pode ser considerado uma matriz complexa, cuja análise não é tarefa fácil. Ao longo dos últimos vinte anos, houve numerosos esforços no sentido de definir ferramentas que permitam avaliar o azeite, como demonstra a vasta quantidade de trabalhos disponíveis na literatura. Algumas das técnicas aplicadas incluem a ressonância magnética nuclear [6], cromatografia gasosa [7], espectroscopia de infravermelho médio [5], espectrofotometria de Ultravioleta-Visível [8], entre outros. A maior parte destes métodos baseia-se na análise do perfil de ácidos gordos e de outros componentes minoritários. Normalmente, alguns métodos de análise convencionais das



amostras são complexos, que requerem tratamentos químicos lentos e destrutivos e utilizando instrumentação de elevado custo [9]. A estratégia geral adotada por vários laboratórios de pesquisa consiste na deteção de um maior número possível de componentes maioritários ou minoritários presentes no azeite. Após a deteção, aplica-se um método de análise estatística multivariada aos resultados obtidos, a fim de construir modelos de classificação de acordo com vários critérios, tais como a origem geográfica, época de colheita e o modo de extração [6]. Na busca de alternativas, foram desenvolvidas línguas eletrónicas baseadas em medições voltamétricas [10] que, também, apresentam algumas dificuldades, uma vez que é necessário diluir no azeite um solvente que permita o uso dessa metodologia. Neste sentido, o trabalho que se apresenta pretende dar um contributo às dificuldades assinaladas nos parágrafos anteriores. O objetivo geral deste trabalho reside no desenvolvimento de uma língua eletrónica capaz caraterizar a impedância elétrica em função da frequência de diferentes tipos de azeite e de azeite virgem extra adulterado com os óleos de amendoim e de girassol. Pretende-se por meio desta ferramenta promissora qualificar amostras de azeite com uma medição simples, rápida e não destrutiva.

O presente trabalho encontra-se estruturado em mais 4 capítulos e uma secção de anexos. O capítulo 2 descreve os principais conceitos relativos ao azeite, desde a sua origem às principais práticas utilizadas na sua adulteração, passando pela sua composição. Ainda no capítulo 2, descrevem-se os conceitos teóricos que fundamentam a língua eletrónica, referindo as suas aplicações e apresenta-se uma técnica da estatística multivariada que permite identificar a relação entre as caraterísticas extraídas de dados experimentais, denominada análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*). No capítulo 3, descrevem-se as amostras submetidas à análise e as respetivas metodologias aplicadas na sua caraterização. Além disso, são descritos os aparelhos e os procedimentos laboratoriais utilizados para os diferentes ensaios. No capítulo 4, procede-se à classificação de vários tipos de azeite utilizando as técnicas de espectrofotometria de Ultravioleta-Visível, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e a espectroscopia de impedância, sendo esta última a principal metodologia deste trabalho. Ainda no capítulo 4, apresenta-se a discriminação de azeite adulterado com outros óleos vegetais por meio da espectroscopia de impedância. No capítulo 5, apresentam-se as conclusões gerais que se obteve com este estudo, expondo o grau de consecução dos objetivos propostos e sugere-se algumas linhas de investigação a seguir em trabalhos futuros. Por fim, apresenta-se a bibliografia que serviu de fundamento desta investigação e uma secção de anexos, onde são apresentadas as fichas de segurança dos compostos utilizados na preparação de filmes finos.





## Conceitos Teóricos

Neste capítulo, abordam-se alguns conceitos relativos ao azeite e os fundamentos das principais metodologias aplicadas neste trabalho, nomeadamente, a espectroscopia de impedância e a técnica estatística de agrupamento de dados (PCA).

### 2.1 A origem e o cultivo da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore que pertence à família das Oleaceae, sendo considerada uma das mais antigas árvores cultivadas pelo homem. É uma espécie emblemática, especialmente, na região do Mediterrâneo devido à sua utilidade, quer na perspetiva ecológica quer na perspetiva económica e cultural. A origem e a história da sua domesticação não é consensual, no entanto, dados arqueológicos e moleculares sustentam que as primeiras espécies surgiram no Levante, muito provavelmente há cerca de 6000 anos, numa região atualmente localizada na fronteira entre o sudoeste da Turquia e o noroeste da Síria [11].

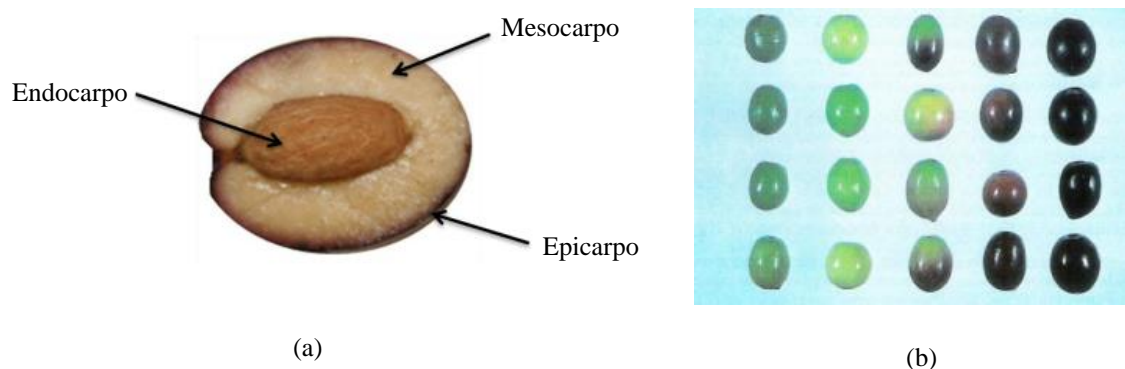
A difusão oliveira foi acompanhada por uma diversificação que conduziu à uma elevada variabilidade genética que reflete numa vasta gama de caracterização, tais como o vigor da árvore, a forma do fruto e o teor do lípido, a morfologia e a fisiologia, sendo estas últimas relacionadas com as características de adaptação ao clima e restrições dos solos. Mais de 2000 variedades mediterrânicas têm sido reconhecidas com base em frutas, na forma das folhas e cores, na arquitetura das árvores e fenologia. As regiões com condições climáticas semelhantes aos dos países da região do Mediterrâneo que é predominado por invernos chuvosos, verões amenos, quentes e secos proporcionam a propagação da oliveira [12]. Assim, o norte mediterrânico (Portugal, Espanha, Itália, Grécia e Turquia) representa cerca de 80% da superfície de oliveira cultivada, o Médio Oriente (Jordânia, Síria, Iraque e Irão) e o Norte de África (Marrocos, Argélia, Tunísia e Egipto)

representam 18% e apenas 2% está localizado no Norte da América (EUA) e no Sul (México, Argentina e Peru) [11].

### 2.1.1 Maturação do fruto da oliveira

O fruto da oliveira, a azeitona, é uma drupa constituída por três tecidos principais: o epicarpo (película epidérmica), o mesocarpo carnudo (polpa) e o endocarpo (caroço), conforme se pode observar na Figura 2.1 (a). As alterações de cores do epicarpo ilustradas na Figura 2.1 (b) variam conforme os diferentes níveis de maturação do fruto que evoluem desde o verde pálido ao negro, passando pelo violáceo ou roxo [13]. Durante o processo de maturação, a clorofila presente na azeitona verde reduz gradualmente, bem como as concentrações de carotenoides, ao mesmo tempo que aumenta o teor em lípidos. A tonalidade negra adquirida pelo epicarpo no final do processo deve-se à formação de antocianinas [14]. Para além da abundância em lípidos, o mesocarpo é composto, principalmente, por água ( $\approx 75\%$ ), açúcares, proteínas, pectina, ácidos orgânicos, taninos, oleuropeína, antocianinas e sais minerais. O endocarpo apresenta-se rijo, estriado e mais ou menos pontiagudo.

Os fatores que determinam a colheita da azeitona estão relacionados com a sua finalidade (azeite ou azeitona de mesa), a variedade, os meios de apanha (manual ou mecanizada) e as condições climáticas. Contudo, a época de maturação do fruto corresponde, regularmente, ao intervalo de tempo entre os meses de Novembro até Fevereiro [13].



**Figura 2.1:** Fotografias de (a) um corte transversal de uma azeitona que mostra o seu aspeto interior com a sua constituição principal (o epicarpo, mesocarpo e o endocarpo) [15] e de (b) diferentes estágios de maturação do epicarpo [16].

## 2.2 Azeite

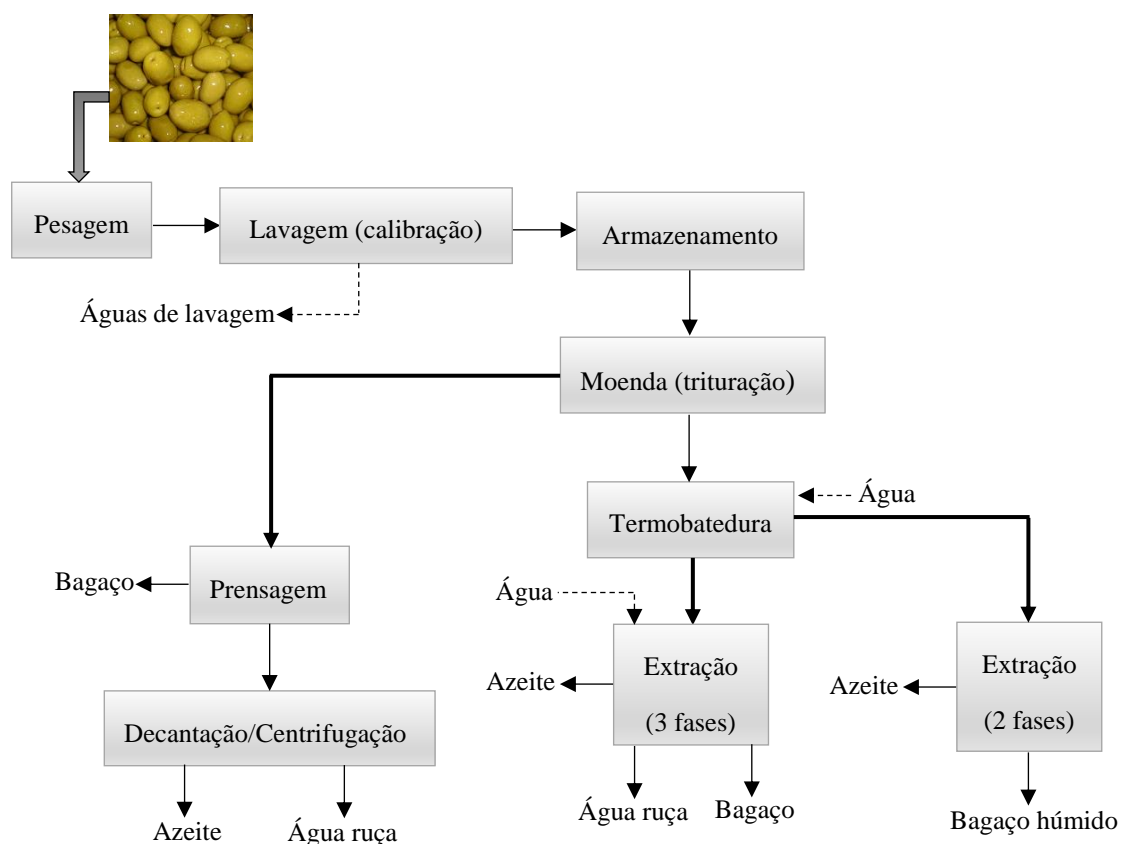
### 2.2.1 Processo de extração do azeite

As primeiras etapas de extração após a colheita e o transporte da azeitona para o lagar, correspondem à pesagem, limpeza e armazenamento do fruto, da qual resulta numa azeitona limpa e pronta a ser processada. Posteriormente, a azeitona armazenada é enviada para a operação moenda que consiste na sua trituração por moinhos de rolos ou metálicos, onde a drupa é esmagada até resultar numa pasta de azeitona espessa. Esta pasta é enviada para a termobatedura, onde é agitada através de um batimento lento e contínuo. Em simultâneo, a azeitona é aquecida numa batedeira que é mantida a temperaturas moderadas, compreendidas entre 25 °C e 28 °C, que promovem a união das gotículas de gordura em gotículas de maiores dimensões que simplifica a sua separação das outras fases da pasta. O batimento e o aquecimento realizam-se na termobatedeira, constituída por um depósito que possui no seu interior umas pás que giram a velocidades entre 15 rpm e 18 rpm, cuja finalidade é voltar a pasta. Após o batimento e o aquecimento da pasta, procede-se à extração propriamente dita, isto é, a separação da fase sólida das fases líquidas. A pasta obtida é bombeada para um sistema de centrifugação horizontal que separa o azeite dos caroços, da pele e da polpa, sendo que a diferente densidade das fases envolvidas permite uma separação fácil.

O processo de extração pode suceder de diferentes formas, podendo ser descontínuo ou de prensas e/ou contínuo com duas e três fases. A diferença entre estes processos ocorre apenas na operação de separação das fases. As etapas anteriores ao processo de extração são comuns a todos os tipos de lagares. O processo descontínuo é o mais clássico e diferencia-se dos outros devido à utilização de um sistema de prensas hidráulicas na separação das fases. Neste processo, origina-se um mosto oleoso que, para além do azeite, é constituído por água ruça e bagaço. A água ruça corresponde a um conjunto de efluentes que inclui a água de vegetação da azeitona, água de lavagem do fruto e a água que é adicionada durante a extração propriamente dita. O bagaço é formado, essencialmente, por resíduos de polpa e caroço da azeitona. A decantação é a forma tradicional utilizada para separar as fases.

Em relação aos processos contínuos, estes abrangem os que originam no final da centrifugação três fases (azeite, bagaço e água ruça) e os que produzem apenas duas fases (azeite e bagaço húmido). No processo contínuo de duas fases, a centrífuga possui duas saídas de líquidos, das quais uma se destina ao azeite e a outra a um subproduto que resulta da mistura da água ruça com o bagaço, originando um efluente muito aquoso denominado bagaço húmido. O bagaço húmido

final resulta das águas de lavagem iniciais da azeitona, às quais se juntam as águas de vegetação da azeitona. No processo contínuo de três fases, para além do azeite, são originados dois subprodutos, nomeadamente, uma massa com pouca água (bagaço) e um efluente de tonalidade castanha mais ou menos escura (água ruça). Este processo de extração é mais utilizado em Portugal e nos restantes países produtores de azeite, exceto Espanha que recorre, maioritariamente, à centrifugação com sistemas de duas fases. Finalmente, o azeite obtido é discriminado de acordo com a sua qualidade, grau de acidez e variedade de azeitona, sendo depois armazenado e, se for o caso disso, embalado em garrafas hermeticamente fechadas e comercializadas [13]. As etapas fundamentais para obter azeite encontram-se representadas de forma concisa na Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Diagrama representativa dos diferentes processos de extração: a prensagem e o contínuo de duas e três fases com os seus respetivos subprodutos.

### 2.2.2 Denominação dos diferentes tipos de azeite

O azeite pode ser classificado com base em valores atribuídos a quatro parâmetros, cujos limites são definidos pela legislação, dos quais, três são químicos (o grau de acidez livre, índice de peróxidos e de absorção em ultravioleta) e o quarto está relacionado com os atributos sensoriais [5].

O grau de acidez livre é um importante índice de qualidade que determina a quantidade de ácidos gordos livres presentes num azeite, expresso em % de ácido oleico. O grau de acidez depende de vários fatores: a manipulação das azeitonas; o clima e as pragas às quais a oliveira esteve exposta; o processo de produção e o armazenamento do azeite, entre outros. Quanto menor for o grau de acidez maior é qualidade do azeite, sendo que valores próximos de 0,1% indicam um estado perfeito. Os peróxidos são produtos originados a partir da oxidação de óleos e gorduras devido à ação do oxigénio e é expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de azeite ( $\text{mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ). Para que o azeite seja indicado para o consumo humano, o seu limite deve ser de  $20 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ . A absorção em ultravioleta (K) é medida em dois comprimentos de onda diferentes, nomeadamente, a 232 nm e 270 nm, representados por  $K_{232}$  e  $K_{270}$ , respetivamente. O  $K_{232}$  representa, tal como o índice de peróxidos, a oxidação inicial de um azeite e o  $K_{270}$ , por sua vez, deteta um estado oxidativo mais avançado [17], [18].

Os atributos sensoriais são classificados por um painel de provadores profissionais que caracterizam o azeite de acordo com a sua apreciação, baseando-se no cheiro e no sabor. O painel prova e compara as diferentes amostras, caracterizando os seus diferentes atributos sensoriais em positivos e/ ou negativos. Os positivos descrevem o sabor particular do azeite que produzem um equilíbrio de notas sensoriais verde, frutado, amargo e picante. No lado oposto, os mais frequentes são o mofo ou húmido, avinagrado ou ácido, tulha e ranço, que podem ser causados por microrganismos, pela oxidação de ácidos gordos e, principalmente, devido ao armazenamento inadequado da azeitona e do próprio azeite [5]. O atributo tulha é o sabor característico de um azeite obtido a partir de azeitonas que se encontram num estado avançado de fermentação. O mofo ou húmido são sabores característicos de um azeite obtido a partir de azeitonas armazenadas em condições de humidade durante vários dias, podendo causar o desenvolvimento de vários tipos de fungos. O avinagrado é uma nota sensorial originada pela elevada concentração de ácido acético, acetato de etilo e etanol. O ranço é uma característica sensorial comum a todos os óleos e gorduras sujeitos ao processo de auto-oxidação que é causado por um contacto prolongado com o ar. Os atributos negativos tulha, mofo e avinagrado são originados devido à preservação inadequada do fruto antes do processamento, enquanto o ranço é produzido durante o armazenamento do azeite [19].

De acordo com o artigo 118º do regulamento do conselho da Comunidade Europeia (CE) de 22 de Outubro de 2007 n.º 1234/2007, referente às normas de comercialização de azeite, as denominações de azeite incluem [20]:

- **Azeite virgem:** É um azeite extraído a partir do fruto da oliveira, unicamente, por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que

não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração. Dependendo da sua acidez, o azeite virgem próprio para o consumo pode ser classificado:

- a) Azeite virgem extra (AVE): É um azeite virgem de alta qualidade com uma acidez livre expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g;
  - b) Azeite virgem (AV): É um azeite virgem com uma acidez livre expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g;
  - c) Azeite virgem lampante (AVL): É um azeite virgem com uma acidez livre expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g.
- Azeite refinado (AR): É obtido por refinação de azeite virgem, em que se utilizam produtos químicos como meio de eliminar características indesejadas (ex: acidez elevada, cheiros ou sabores acentuados, cores anômalas, etc.). Possui uma acidez livre expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g.
  - Azeite composto por azeite refinado e azeite virgem (ARV): É obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g;
  - Óleo de bagaço de azeitona (OBA): Óleo constituído por loteamento de óleo de bagaço de azeitona refinado e de azeite virgem com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 1 g por 100 g.

### 2.2.3 Composição química do azeite

As qualidades nutricionais do azeite têm sido atribuídas à sua diferente composição, relativamente aos outros óleos vegetais que se reparte em duas frações: uma fração maioritária que representa  $\approx 98\%$  do seu peso total e uma fração minoritária com  $\approx 2\%$ . A primeira fração é constituída, essencialmente, por triacilgliceróis e ácidos gordos livres. Os componentes principais da fração menor incluem hidrocarbonetos, esteróis, álcoois alifáticos, ceras, compostos fenólicos, pigmentos, vitaminas, tocoferóis e compostos voláteis [21].

- **Fração maioritária**
  - Triacilgliceróis: Os triacilgliceróis ou triglicéridos são ésteres que resultam da união de uma molécula de glicerol com três ácidos gordos livres.



- Ácidos gordos: O teor de ácidos gordos é um parâmetro que permite qualificar o azeite. Os ácidos gordos são classificados conforme o número de carbonos que os compõem e o grau de saturação. O ácido gordo mais abundante no azeite é o oleico (C18:1), seguido do palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) e esteárico (C18:0) que representam cerca de 88% da composição total de ácidos gordos. Da composição de ácidos gordos incluem ainda, em menor quantidade, o linolénico (C18:3), lignocérico (C24:0), araquídico (C20:0), mirístico e o beénico (C22:0) [22].

- **Fração minoritária**

- Hidrocarbonetos: Os hidrocarbonetos presentes em abundância no azeite são o esqualeno e o  $\beta$ -caroteno. O esqualeno é um hidrocarboneto insaturado que representa cerca de 40% da fração minoritária. O  $\beta$ -caroteno é um dos pigmentos responsáveis pela cor do azeite e constitui também um precursor da vitamina A [23].
- Esteróis: Estes componentes podem ocorrer na forma livre, ou esterificados com ácidos gordos. O teor de esteróis permite identificar a origem e a pureza de um azeite. A diminuição dos esteróis durante o armazenamento tem sido relacionada com o aumento do valor do índice de peróxidos. Os esteróis totais estão ainda relacionados com a acidez livre, sendo que os azeites com uma alta percentagem de acidez também apresentam altos valores de esteróis totais [22], [23].
- Álcoois alifáticos: Os álcoois alifáticos são uma importante categoria dos componentes da fração minoritária que podem ser usados como critério de distinção dos diferentes tipos de azeite. As diferentes concentrações dos diferentes álcoois são particularidades da variedade de azeitona e da região em que é produzido o azeite [23].
- Ceras: As ceras são ésteres de ácidos gordos com álcoois de cadeia longa de elevado ponto de fusão. As ceras encontram-se na pele da azeitona e evitam a perda de água. A elevada acidez dos azeites contribui para o aumento da quantidade de ceras devido à esterificação de álcoois alifáticos com ácidos gordos livres. As ceras podem ser utilizadas como um critério para a distinção das variedades de azeite [22].
- Compostos fenólicos: Os compostos fenólicos (fenóis simples, tais como o hidroxitirosol e fenóis complexos, tais como a oleuropeína) são antioxidantes que têm sido associados ao menor risco de doenças cardíacas e à prevenção do envelhecimento [24]. Estes compostos estão relacionados com a avaliação sensorial do azeite, dando-

lhês particularidades únicas. A sua composição no azeite é muito complexa e a sua concentração difere consoante alguns fatores, tais como o estado de maturação, as condições climáticas e o armazenamento do fruto utilizado no decorrer da produção [22]. Por exemplo, como azeite virgem não é refinado contém vários compostos da fração minoritária, nomeadamente, os fenóis que são normalmente removidos no processo de refinação.

- **Pigmentos:** O azeite pode ser constituído por duas classes de pigmentos naturais, responsáveis pela cor, nomeadamente, as clorofilas e os carotenoides. Os pigmentos carotenoides mais importantes são o  $\beta$ -caroteno e a luteína, enquanto os principais pigmentos do grupo clorofila é a feofitina-a e feofitina-b. Os carotenoides são responsáveis pela cor amarelada dos azeites. Quando se extrai o azeite de azeitonas maduras (negras), a feofitina é praticamente o único pigmento presente.
- **Vitaminas:** As vitaminas lipossolúveis identificadas no azeite são: vitamina A, vitamina D, vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e vitamina K.
- **Tocoferóis:** Os tocoferóis integram um grupo de substâncias denominadas por vitamina E que contribuem para a estabilidade do azeite, pois inibem a sua oxidação [23].
- **Compostos voláteis:** Os azeites de alta qualidade possuem um perfil de compostos voláteis constituídos, principalmente, por aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas que originam um aroma equilibrado de características sensoriais verdes e frutados [19]. Alguns destes compostos são formados por enzimas endógenas das plantas, sobretudo a lipoxigenase. Os azeites de baixa qualidade, também, apresentam perfis de aroma complexo que compreendem um grande número de compostos voláteis originados pela oxidação química e por enzimas exógenas. Alguns destes compostos dão origem às notas sensoriais desagradáveis. Assim, o estudo dos compostos presentes na fração volátil de azeite pode dar informação sobre a composição sensorial dos mesmos [7].

#### **2.2.4 Fatores que influenciam a qualidade de azeite**

A qualidade do azeite pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo: o clima, o solo e a latitude da região da produção da azeitona, o método de colheita, o tipo de transporte para o lagar, o tempo de processamento da azeitona, a temperatura e o equipamento de processamento. O estado de maturação, aquando da colheita da azeitona, é determinante e pode originar azeites com diferentes níveis de maturação. Este fator pode modificar o sabor e o aroma

do azeite [22].

Os materiais empregues nas embalagens de armazenamento (para proteger o produto do oxigénio e da luz) podem influenciar diretamente a qualidade do azeite. Os materiais mais comuns utilizados para a embalagem do azeite incluem o vidro e o plástico. O vidro é, provavelmente, o material mais utilizado e o seu desempenho é incomparável a nível de impermeabilidade a gases e aromas e o impacto ambiental. O plástico poli(tereftalato de etileno) (PET) é cada vez mais utilizado por apresentar as seguintes características: inércia química, inquebrável, reciclável, barato e apresenta excelentes propriedades mecânicas, tendo demonstrado capacidade de preservar as características do azeite virgem durante a sua vida de prateleira. Apesar das vantagens apresentadas, a utilização do plástico para a embalagem de azeite é condicionada por alguns inconvenientes, nomeadamente, a permeabilidade da garrafa PET relativamente a gases e vapores (o oxigénio e a humidade) e a possível migração de compostos com baixo peso molecular. Os fatores que mais influenciam o nível de oxidação num determinado tempo de armazenamento são: a quantidade de oxigénio dissolvido no azeite (aquando do engarrafamento), a permeação de oxigénio através das paredes, a luz, a temperatura, a humidade, a composição química do azeite e o conteúdo antioxidante natural. A incorporação de pigmentos e de agentes bloqueadores de UV ou de absorvedores de oxigénio nas garrafas de plástico podem melhorar as suas propriedades. A utilização de garrafas de vidro pigmentadas também tem demonstrado uma maior proteção do azeite à exposição da luz [25], [26].

### **2.2.5 Adulteração de azeite**

A prática mais comum na adulteração de azeite consiste na mistura do AVE com óleos de categorias inferiores (óleo de bagaço de azeitona ou azeite virgem obtido pela segunda centrifugação de azeitonas) ou óleos de sementes (óleo de amêndoa, soja, palma ou de girassol). Estas práticas, para além de deteriorar a qualidade e o valor nutricional do azeite, originam grandes perdas económicas e de confiança por parte dos consumidores [27].

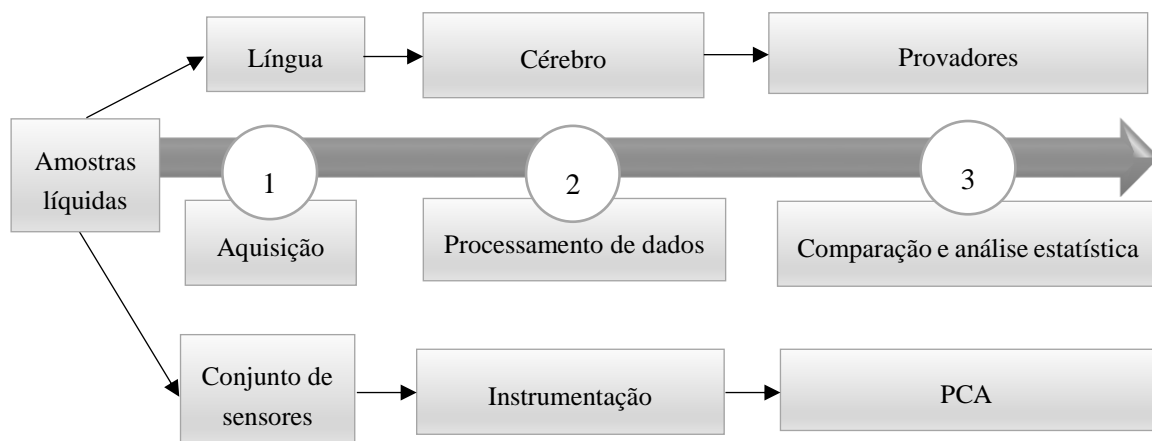
Todos os anos são comunicados alguns casos de fraude. Por exemplo, em Março de 2015, em Portugal, a Associação Portuguesa para a Defesa do Consumidor (DECO), baseando-se nos rótulos, analisou eventualmente 26 AVE. Destas análises foram detetados 4 amostras não conformes, sendo estes pertencentes à categoria AV [28].

## **2.3 Língua eletrónica aplicada na análise de líquidos**

O sabor é um dos sentidos químicos, cujo recetor é excitado por estimulantes químicos. Os recetores do sabor são as células sensoriais das papilas gustativas presentes na língua, estimuladas

pelas moléculas presentes nos alimentos. Sabe-se que na deteção de um sabor são produzidos uma série de impulsos elétricos com intensidades diferentes que são transmitidos para o cérebro, onde são comparados para a identificação de sabores. O princípio de funcionamento do sistema do sabor humano inspirou o desenvolvimento de instrumentos que permitiram imitar a sua capacidade de classificação e diferenciação de substâncias complexas. A Figura 2.3 mostra uma representação esquemática da analogia que pode ser estabelecida entre o sistema do sabor humano e a língua eletrónica na deteção de sabores, podendo ser encontradas algumas aproximações na sua estrutura e no princípio de funcionamento [29].

O instrumento desenvolvido é denominado língua eletrónica (LE) que é definido como um sistema composto por um conjunto de sensores não específicos, de baixa seletividade e utiliza procedimentos matemáticos para o processamento de sinal, a fim de atingir os objetivos da análise. Por conseguinte, a LE pode ser considerada como uma ferramenta analítica que inclui uma série de sensores que visa o reconhecimento da composição qualitativa (classificação e discriminação) ou quantitativa de amostras com composições complexas. Ao contrário de outros métodos analíticos, a LE apenas apresenta uma impressão digital da amostra sem a aquisição de dados sobre a natureza dos compostos. Normalmente, os sensores são imersos numa amostra líquida e obtém-se um padrão de sinais elétricos. A resposta é não específica porque os sensores não respondem a um componente particular da amostra. Ao invés, os sensores respondem, de um modo geral, aos seus diversos constituintes [30]. As características de uma LE dependem dos materiais que compõem os sensores, do procedimento matemático utilizado no tratamento de dados e da amostra em estudo, sendo este último sujeito à presença dos diferentes compostos e iões [31].



**Figura 2.3:** Representação esquemática das etapas de deteção e reconhecimento do sabor e da analogia existente entre uma LE e o sensor do sabor humano.

### **2.3.1 Princípio de deteção e aplicações de línguas eletrónicas**

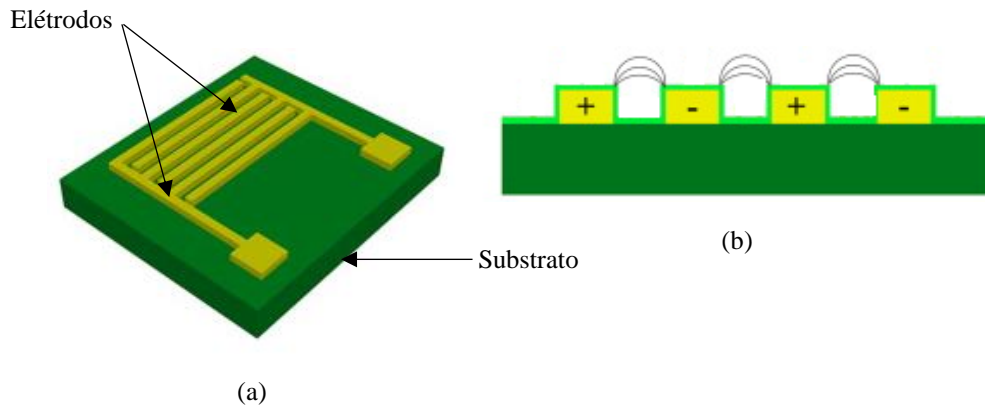
O tipo de sensor usado na LE depende do princípio de deteção que pode basear em técnicas eletroquímicas, tais como a potenciometria e a voltametria [29]. Nos sistemas potenciométricos, mede-se um potencial entre os dois elétrodos sem fluxo de corrente, enquanto nos voltamétricos é aplicado um potencial e medido a corrente resultante. A principal diferença entre os dois princípios de funcionamento reside na forma de medição [30], [32]. Tem-se dedicado à investigação destas técnicas devido à sua simplicidade e versatilidade. Como exemplo de sistemas potenciométricos encontram-se aplicações na identificação de adulteração do leite de cabra com leite bovino [33], na degustação de diferentes bebidas (chá, café, cerveja, refrigerantes e sumos), entre outros. As LE voltamétricas são aplicadas, por exemplo, em sistemas que monitorizam a qualidade da água em estações de tratamento de águas residuais [32], na monitorização da qualidade e do tempo de armazenamento do leite pasteurizado [33], entre outros. Embora em quantidades reduzidas, a literatura também oferece alguns trabalhos baseados em voltametria que estudam o azeite. Alguns dos trabalhos são: combinação de uma LE com um nariz eletrónico para a classificação de perfis de AV marroquino [34]; quantificação e qualificação de compostos fenólicos encontrados em AV [10]; deteção de adulterações no AVE [35]. As medições potenciométricas são mais simples que as voltamétricas, no entanto, as primeiras por si só são sensíveis ao ruído eletrónico. O método voltamétrico é mais versátil e robusta e as perturbações elétricas são mais reduzidas e quando é usado em meios complexos a interpretação dos espectros obtidos poderá ser difícil [30], [32], [36].

Uma outra opção de princípio de funcionamento da LE baseia-se na espectroscopia de impedância com o uso de sensores interdigitados capacitivos. O presente trabalho incide neste tipo de LE que apresenta as seguintes vantagens: pode ser construída no laboratório; possui uma instrumentação simples e de baixo custo; a interpretação dos resultados não é complexa; a flexibilidade do tamanho e sensibilidade do sensor. O número de estudos dedicados a analisar o azeite por espectroscopia de impedância ainda é escasso. Na literatura, encontram-se dois trabalhos com a aplicação desta técnica, em que um faz a discriminação de adulteração de azeite [37] e o outro o estudo das propriedades dielétricas de óleos e ácidos gordos [9].

### **2.3.2 Princípio de funcionamento de sensores interdigitados capacitivos**

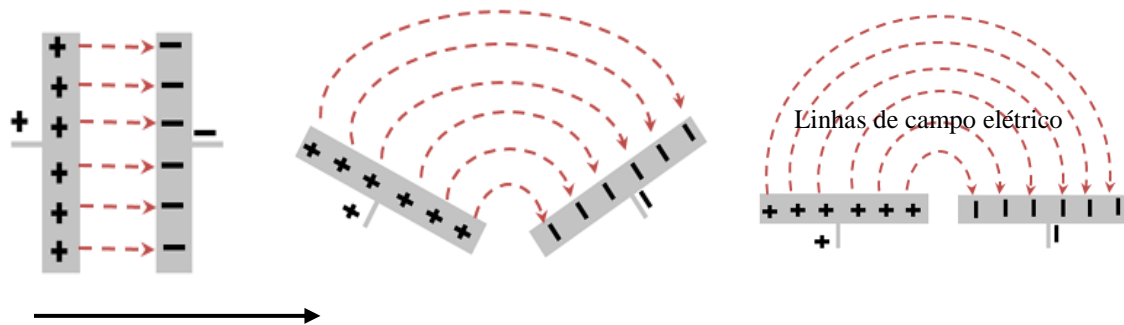
Um sensor é um dispositivo que deteta e converte um sinal numa quantidade mensurável. O sensor interdigitado capacitivo é uma estrutura que compreende um substrato de material dielétrico, em que é depositado um material condutor disposto perpendicularmente às bandas laterais e paralelamente entre si, sem que os elétrodos de uma banda estabeleçam contacto com os

elétrodo da outra banda. Portanto, este tipo de elétrico denomina-se interdigitado [38]. Na Figura 2.4, encontra-se representado um modelo de um sensor interdigitado.



**Figura 2.4:** Ilustração da configuração geral dos elétrodo (a) e de uma corte transversal de um sensor interdigitado (b). Adaptado [39].

O princípio de funcionamento de um sensor interdigitado capacitivo é semelhante ao de um condensador de placas paralelas. A relação entre estes dispositivos é mostrada na Figura 2.5 que representa a transformação de um condensador de placas paralelas num sensor interdigitado capacitivo. Com a aplicação de uma diferença de potencial em cada um dos elétrodo, formam-se campos elétricos que se deslocam a partir dos elétrodo positivos para os negativos.



**Figura 2.5:** Esquema representativo do princípio de funcionamento de um sensor interdigitado capacitivo.

O dispositivo mede as variações da capacidade de uma amostra que se encontra em cima da área dos elétrodo e esta variação é originada pela proximidade dos elétrodo que geram os campos elétricos, fazendo com que as linhas de campo penetrem na amostra. Com a variação das amostras, as linhas de campo sofrem interferências originando alterações na capacidade [40]. A capacidade entre os elétrodo pode ser influenciada quer pela geometria dos elétrodo quer pelas propriedades dielétricas dos materiais. Como os elétrodo são interdigitados a capacidade medida

tem uma proporção muito elevada de sinal-ruído. A fabricação destes sensores é, normalmente, por meio da litografia que permite o desenvolvimento de dispositivos com alta sensibilidade, baixo custo [39].

Como já foi referido, a baixa seletividade e a alta sensibilidade são os requisitos essenciais na seleção de um sensor para um sistema que se pretende usar numa LE [31]. Estas particularidades consistem na capacidade de um sensor responder a um número diferente de moléculas em solução e num sistema de vários sensores. Isto implica que diferentes sensores vão produzir sinais diferentes para a mesma matriz que constituem um perfil de sinais da amostra (espectro) [30].

## 2.4 Espetroscopia de impedância

### 2.4.1 Definição de impedância

A noção “resistência” como um parâmetro que, normalmente, está associado a resistências requer uma especial atenção, pois, tal como num circuito elétrico em corrente contínua (DC), os circuitos em corrente alternada (AC) também possuam componentes que oferecem resistência à passagem de uma corrente. Para além das resistências, os condensadores e as bobinas também oferecem obstáculos à passagem de uma corrente alternada. A este género de resistência elétrica designa-se reatância. A diferença entre a resistência e a reatância, em termos de energia dissipada, reside no facto de a energia ser dissipada somente na forma de calor na resistência, ao passo que a energia é armazenada periodicamente em campos elétricos ou magnéticos sem que haja perdas por calor na reatância.

Define-se impedância como sendo a ação conjunta de resistências e reatâncias, cujo cálculo pode ser obtido pela análise da tensão nos componentes resistência ( $R$ ), bobina ( $L$ ) e condensador ( $C$ ) em série representados na Figura 2.6. Admitindo que a corrente que flui através dos componentes é da forma  $i = I \cos(\omega t)$ , onde  $i$  representa o valor da corrente num instante  $t$ .



**Figura 2.6:** Representação da corrente  $i$  através dos componentes  $R$ ,  $L$  e  $C$  em série.

Nos componentes  $R$ ,  $L$  e  $C$  as tensões instantâneas  $v_R$ ,  $v_L$  e  $v_C$  são dadas respetivamente por :

$$v_R = Ri = RI \cos(\omega t) \quad (1)$$

$$v_L = L \frac{di}{dt} = -\omega LI \sin(\omega t) = \omega LI \cos\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \quad (2)$$

$$v_C = \frac{q}{C} = \left(\frac{1}{wC}\right) I \sin(wt) = \left(\frac{1}{wC}\right) I \cos\left(wt - \frac{\pi}{2}\right) \quad (3)$$

Onde na expressão (3), foi utilizada a relação:  $q = \int i \, dt$ . As equações anteriores demonstram que a tensão  $v_R$  está em fase com a corrente e que, em relação à corrente,  $v_L$  está adiantada de  $\frac{\pi}{2}$  enquanto  $v_C$  está atrasada de  $\frac{\pi}{2}$ . Os coeficientes  $RI$ ,  $wLI$  e  $\left(\frac{1}{wC}\right)I$  têm dimensão de Volt e revelam as amplitudes das tensões nos componentes  $R$ ,  $L$  e  $C$ , respetivamente. Utilizando  $V_R$ ,  $V_L$  e  $V_C$  para representá-las, obtêm-se:

$$V_R = RI \quad (4)$$

$$V_L = wLI \quad (5)$$

$$V_C = \left(\frac{1}{wC}\right)I \quad (6)$$

Estas equações indicam que, para  $w$  constante, existe uma relação de proporcionalidade entre a tensão e a corrente máxima em cada componente. Considerando  $wL = X_L$  e  $\frac{1}{wC} = X_C$ , as relações (5) e (6) são escritas da seguinte forma:

$$V_L = X_L I \quad (7)$$

$$V_C = X_C I \quad (8)$$

As expressões (7) e (8) são semelhantes à lei de Ohm, assim sendo, tanto  $X_L$  como  $X_C$  são medidas em ohms. Medem, numa certa frequência, a resistência à corrente alternada oferecida pela indutância e pelo condensador, respetivamente, sendo a grandeza  $X_L$  designada reatância indutiva e  $X_C$  reatância capacitiva.

De forma a obter uma relação de proporcionalidade entre a tensão total máxima que atua nos três componentes em série e a corrente que os atravessa calcula-se a tensão instantânea total  $v$ , dada pela soma algébrica:  $v_R + v_L + v_C$ . Recorrendo as expressões (1), (2) e (3), resulta:

$$v = RI \cos wt + \left(\frac{1}{wC} - wL\right) I \sin(wt) \quad (9)$$

Relembrando que a relação trigonométrica  $a \cos x + b \sin x$  pode ser expressa na forma  $A \cos(x + \phi)$ , onde  $A = \sqrt{a^2 + b^2}$  e  $\tan \phi = \frac{-b}{a}$ , assim sendo, a equação (9) pode ser escrita na forma:

$$v = V \cos(wt + \phi) \quad (10)$$

onde  $V$  e  $\phi$  são dados por:



$$V = I\sqrt{R^2 + \left(wL - \frac{1}{wC}\right)^2} = I\sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \quad (11)$$

$$\phi = \arctg\left(\frac{wL - \frac{1}{wC}}{R}\right) = \arctg\left(\frac{X_L - X_C}{R}\right) \quad (12)$$

A raiz quadrada da equação (11), usualmente, representada pela letra  $Z$ , é denominado impedância dos três componentes em série da Figura 2.6. Assim, esta equação pode ser escrita da seguinte forma:

$$V = ZI \quad (13)$$

A expressão (13) é formalmente idêntica à lei de Ohm, sendo que a impedância  $Z$  exerce a mesma função da resistência equivalente no circuito DC. Esta expressão demonstra ainda que existe também uma relação de proporcionalidade entre o valor máximo da tensão total e o valor máximo da corrente. Por fim, obtêm-se a impedância para os componentes em série, dada por:

$$Z = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \quad (14)$$

#### 2.4.2 Circuito equivalente: resistência e condensador em paralelo

Para a análise de circuitos com elementos em paralelo, considera-se o caso simples de uma resistência e de um condensador em paralelo alimentados por uma tensão comum do tipo  $v = V \cos wt$ . As correntes instantâneas  $i_R$  e  $i_C$  através da resistência e do condensador são dadas respectivamente por:

$$i_R = \frac{v}{R} = \frac{V}{R} \cos wt = I_R \cos wt \quad (15)$$

e

$$i_C = \frac{dq}{dt} = C \frac{dv}{dt} = -wCV \operatorname{sen} wt = -\frac{V}{X_C} \operatorname{sen} wt = I_C \cos\left(wt + \frac{\pi}{2}\right) \quad (16)$$

Consequentemente, a corrente total instantânea  $i = i_R + i_C$  é dada por:

$$i = I_R \cos wt - I_C \operatorname{sen} wt$$

ou

$$i = I \cos(wt + \phi) \quad (17)$$

Onde

$$I = \sqrt{I_R^2 + I_C^2} \quad (18)$$

$$\text{e } \phi = \arctg \frac{I_C}{I_R}$$

As expressões anteriores indicam que a corrente total pode ser imaginada como o vetor resultante de dois vetores de módulos respectivamente iguais a  $I_R$  e  $I_C$  e perpendiculares entre si. O ângulo  $\phi$  entre  $I_R$  e  $I$  representa a defasagem entre a corrente  $i$  e a tensão  $v$ , que de acordo com a equação (15) está em fase com  $i_R$ . Usando a relação de Euler,  $e^{j\omega t} = \cos \omega t + j \sin \omega t$ ,  $j^2 = -1$ , substitui-se as funções cosseno ou seno por funções exponenciais complexas. Assim, a corrente  $i = I \cos(\omega t)$  usada na primeira análise em que se calculou a impedância nos três elementos, pode ser substituída por  $i^* = I e^{j\omega t}$ . Desta forma, as quantidades  $\frac{di}{dt}$  e  $q = \int i dt$  transformar-se-ão em  $\frac{di^*}{dt} = j\omega I e^{j\omega t}$  e  $q^* = \left(\frac{1}{j\omega}\right) I e^{j\omega t}$ , respectivamente. A tensão aplicada nos três elementos da Figura 2.6,  $v = Ri + L \frac{di}{dt} + \frac{q}{C}$ , deve ser substituída pela expressão:

$$v^* = \left(R + j\omega L + \frac{1}{j\omega C}\right) I e^{j\omega t} \quad (19)$$

ou

$$v^* = \left(R + j\omega L + \frac{1}{j\omega C}\right) i^* \quad (20)$$

com  $i^* = I e^{j\omega t}$ .

A equação (19) é importante porque mostra que é possível representar as reatâncias indutivas e capacitivas por quantidades complexas. Se como de costume, as quantidades reais forem representadas por vetores paralelos ao eixo  $x$  e as quantidades imaginárias por vetores paralelos ao eixo  $y$ , a impedância complexa será representada por um vetor de módulo  $Z$ , cujo argumento será igual ao ângulo de fase  $\phi$ . O fator entre parêntesis da equação (19) é uma quantidade complexa com dimensão de resistência, que é definido como a impedância complexa e representado pela letra  $Z^*$ . Assim,

$$Z^* = R + j\omega L + \frac{1}{j\omega C} = R + j\left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right) = R + j(X_L - X_C) = Z \exp j\phi \quad (21)$$

$$\text{Onde } Z = |Z^*| = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \text{ e } \tan \phi = \frac{X_L - X_C}{R} \quad (22)$$

Que são resultados obtidos anteriormente em (12) e (14). Usando a impedância complexa  $Z^*$ , a equação (20) pode ser escrita na forma:

$$v^* = Z^* i^* = Z e^{j\phi} I e^{j\omega t} = Z I e^{j(\omega t + \phi)} \quad (23)$$

A parte real da equação (23) é  $v = Z I \cos(\omega t + \phi) = V \cos(\omega t + \phi)$ , tal como na equação (10).

Estendendo-se o tratamento desenvolvido acima pode-se mostrar que a impedância resultante  $Z^*$

de um circuito composto por várias impedância em série,  $Z_1^*, Z_2^*, \dots, Z_n^*$  é dada por:

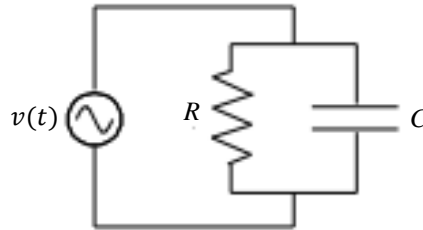
$$Z^* = Z_1^* + Z_2^* + \dots + Z_n^* \quad (24)$$

Supondo que uma associação de uma resistência com um condensador é alimentada por uma tensão do tipo  $v = V \cos wt$ . Do ponto de vista prático despreza-se a bobina, dado que ao aplicar o método de espectroscopia de impedância, supõe-se que a amostra do material a ser investigada possa ser substituída por um circuito equivalente constituída unicamente pela resistência e condensador, tal como mostra o circuito da Figura 2.7. Ao ligar diretamente à fonte AC, uma associação de uma resistência com um condensador em paralelo, a impedância complexa do circuito poderá ser calculada por meio da equação (24), fazendo  $Z_1^* = R$  e  $Z_2^* = \frac{1}{j\omega C}$ . Assim,  $\frac{1}{Z^*} = \left(\frac{1}{R}\right) + j\omega C$  ou  $Z^* = \frac{R}{(1+j\omega RC)}$ . Multiplicando o numerador e o denominador desta fração por  $1 - j\omega RC$ , resulta:

$$Z^* = \frac{R(1-j\omega RC)}{1+(\omega RC)^2} = \frac{R}{1+(\omega RC)^2} - \frac{\omega R^2 C}{1+(\omega RC)^2} j \quad (25)$$

Desta equação, conclui-se que:

$$|Z^*| = Z = \frac{R \sqrt{1+(\omega RC)^2}}{1+(\omega RC)^2} \quad (26)$$



**Figura 2.7:** Representação de um circuito em paralelo constituído por uma resistência ( $R$ ) e um condensador ( $C$ ) alimentados por uma fonte de tensão do tipo  $v(t) = V \cos wt$ .

A espectroscopia de impedância é uma técnica que consiste no estudo da resposta resultante de uma amostra colocada entre dois elétrodos por meio da aplicação de um estímulo elétrico. Normalmente, é utilizada uma tensão alternada do tipo sinusoidal como estímulo e mede-se as medidas da parte real (resistência) e imaginária (capacidade) de impedância complexa em função da frequência. Desta forma, os gráficos da parte real e da parte imaginária da impedância em função da frequência formam o espectro de impedância para um determinado dispositivo que é formado com a amostra do material e os elétrodos [41].

Como foi referido anteriormente, a variante do sensor utilizado neste estudo possui material

dielétrico que separa as duas bandas condutoras, tendo um comportamento semelhante a um condensador de placas paralelas. Desta forma, a corrente que atravessa este tipo de dispositivo, quando é submetido a um campo elétrico alternado deveria estar avançada de  $\varnothing = \frac{\pi}{2}$  em relação à tensão, no entanto, pelo fato de existir uma variação de potencial resultante da queda da resistência do dielétrico, haverá uma componente da corrente que está em fase com a tensão e o ângulo de diferença de fase será  $(\frac{\pi}{2} - \delta)$ , onde  $\delta$  designa o ângulo de perdas. A tangente deste ângulo ( $tg\delta$ ), é denominado fator de dissipação, que é um parâmetro de caracterização do comportamento elétrico dos materiais, uma vez que é uma indicação do grau de qualidade do meio dielétrico e, representa a dissipação relativa de calor no meio dielétrico quando submetido a um campo elétrico alternado. Quanto menor for o fator de dissipação de um dielétrico melhor o dispositivo desempenha as suas funções. O fator de dissipação varia consoante cada material e está sujeito às condições físicas a que o mesmo se encontra submetido, particularmente a temperatura. O fator de dissipação pode ainda ser definido por [38]:

$$tg\delta = \frac{R}{|X_C|} = wCR \quad (27)$$

## 2.5 Análise de componentes principais

A extração de informações dos resultados de uma experiência, por vezes envolve a análise de um grande número de variáveis. Em muitos casos, no conjunto destas variáveis, algumas revelam-se pouco significativas, ou mesmo redundantes na interpretação dos resultados, estando as informações mais importantes concentradas num conjunto de dados menor. A informação relevante pode ser obtida recorrendo a métodos estatísticos que permitam reduzir a dimensão dos dados a considerar na análise, sem perder informação relevante. Um dos métodos estatísticos muito utilizado para reduzir a dimensão dos dados é denominado análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*).

A PCA é uma técnica de estatística multivariada que consiste, essencialmente, em transformar um conjunto de variáveis originais correlacionadas num novo conjunto reduzido de novas variáveis não correlacionadas denominadas componentes principais e que retenham a maior informação estatística possível. As componentes principais são combinações lineares de todas as variáveis originais e são independentes entre si, em termos de variação total contida nos dados. As componentes principais são selecionadas de acordo com a ordem decrescente da sua variância, isto é, a primeira componente principal apresenta maior informação estatística que a segunda, que por sua vez, possui maior informação que a terceira componente e assim por diante. O objetivo da aplicação desta técnica é redistribuir a variação observada dos dados originais de forma a obter

um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Esta técnica agrupa as observações conforme suas variâncias, isto é, de acordo com a variação das suas características. A redução de variáveis por meio desta técnica permite obter uma representação gráfica com a menor perda de informação possível.

Para a aplicação da PCA é necessário decidir, previamente, se todas as variáveis originais devem ser incluídas na análise e quais as que precisam de ser transformadas. De seguida, os dados selecionados são organizados numa matriz  $X$  de ordem  $n \times p$ , designada de matriz de dados e que representa  $n$  observações (correspondentes às linhas) e  $p$  variáveis (correspondentes às colunas) [42]. A partir de  $X(n \times p)$ , obtém-se a matriz de covariância  $S$  que é quadrada e simétrica de ordem  $(p \times p)$  e, portanto, é uma matriz diagonalizável que assume a seguinte transformação ortogonal:

$$U'SU = L \quad (28)$$

Onde  $U$  é uma matriz ortogonal, cujas colunas  $u_1, u_2, \dots, u_p$  correspondem aos vetores próprios ortogonais de  $S$ ,  $U'$  é a matriz inversa de  $U$  e  $L$  é uma matriz diagonal. Os elementos diagonais de  $L$ ,  $l_1, l_2, \dots, l_p$  são designados de valores próprios de  $S$  e podem ser obtidos através da equação característica dada por:

$$|S - lI| = 0 \quad (29)$$

Onde  $I$  representa a matriz identidade. Os vetores próprios  $u_i, i = 1, \dots, p$  são determinados pela resolução do seguinte sistema de equação:

$$[S - lI]u_i = 0, \quad i = 1, \dots, p \quad (30)$$

Os eixos das novas coordenadas passam a ser descritos pelos vetores próprios  $u_i$ . Este procedimento descreve a rotação do eixo principal no eixo de coordenadas originais. Assim, definindo  $X_1, X_2, \dots, X_p$  como sendo as  $p$  variáveis de dimensão  $n$ , representadas na matriz de dados  $X$ , as componentes principais  $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$  são obtidas através de:

$$Z_i = u_i' [X_i - \bar{X}_i], \quad i = 1, \dots, p \quad (31)$$

Onde  $\bar{X}_i$  é a média de  $X_i$ . Após determinar as componentes principais, é necessário calcular a sua contribuição individual  $C_i$  para a explicação da variação total dos dados através de:

$$C_i = \frac{l_i}{\sum_i l_i} \times 100, \quad i = 1, \dots, p \quad (32)$$

A importância de uma componente principal é avaliada por intermédio de sua contribuição, isto

é, pela proporção de variância total explicada pela componente. As componentes principais escolhidas passam a ser as novas variáveis, passando a análise a ser efetuada sobre os seus valores (coordenadas), vulgarmente designadas de “z-scores”, permitindo, assim, obter uma representação gráfica dos dados sem a menor perda possível de informação [43].



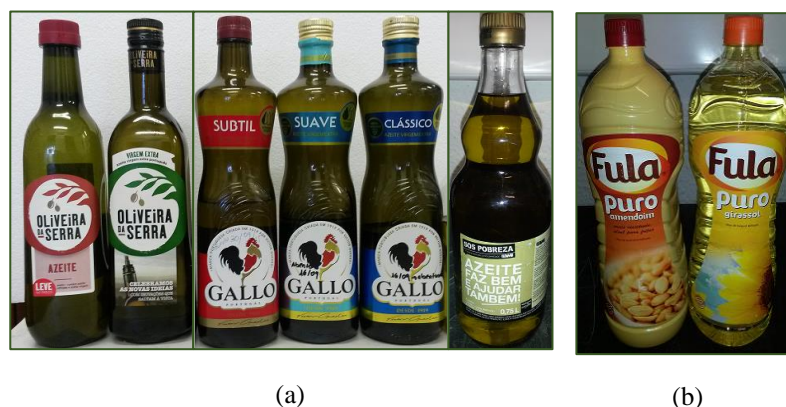
## **Amostras e Métodos Experimentais**

Neste capítulo, são descritas as amostras analisadas, os métodos e os procedimentos experimentais utilizados na sua caracterização.

### **3.1 Amostras de azeite e óleo vegetal**

As amostras foram obtidas a partir de seis garrafas de azeite de marcas Portuguesas que foram seleccionadas de acordo com o rótulo, cuja avaliação é de AVE e ARV. Dos seis azeites, três pertencem à marca Gallo, dois à Oliveira da Serra e um é de cariz social produzido pela Assistência Médica Internacional (AMI) que é uma organização não-governamental. A Figura 3.1 (a) ilustra os azeites em embalagens cilíndricas de vidro e plástico com a capacidade de 750 mL. Todas as garrafas de azeite são pigmentadas coma a exceção da garrafa da AMI.

Para discriminar azeite adulterado, foram seleccionadas duas variedades de óleo vegetal da marca Fula, nomeadamente, o Óleo Fula Puro Amendoim e o Óleo Fula Puro Girassol. A Figura 3.1 (b) ilustra as garrafas de óleo que tem a capacidade de 1 L. O OLFPA é um produto obtido a partir de amendoins de origem seleccionada, sendo muito resistente a frituras intensas a temperatura de 175 °C. Por outro lado, o OLFPG é extraído a partir de sementes de girassol que apresenta um alto teor de ácidos gordos polinsaturados. Logo após a aquisição num hipermercado local, as amostras foram armazenadas num local escuro e seco à temperatura ambiente.



**Figura 3.1:** Fotografias das garrafas de (a) Oliveira da Serra Refinado e Virgem, Oliveira da Serra Virgem Extra, Gallo Subtil Refinado e Virgem, Gallo Suave Virgem Extra, Gallo Clássico Virgem Extra, e SOS Pobreza Refinado e Virgem da AMI e dos (b) óleos Fula Puro Amendoim e Fula Puro Girassol usados para as misturas com o AVE.

Na Tabela 3.1 apresentam-se as categorias dos azeites e dos tipos de óleo da marca Fula com a atribuição de uma nomenclatura. As características físico-químicas dos azeites são descritas de acordo com a informação do rótulo e são mostradas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.1:** Descrição das amostras de azeite com a classificação de AVE e ARV e dos óleos utilizados na preparação de misturas com o AVE.

Categorias	Marcas de azeites/Óleos	Nomenclatura
AVE	Gallo Clássico	GLCLVE
	Gallo Suave	GLSUVE
	Oliveira da Serra	OLSVE
ARV	Gallo Subtil	GLSBRV
	Oliveira da Serra	OLSRV
	SOS Pobreza	SOSPBRV
Óleos refinados	Óleo Fula Puro Amendoim	OLFPA
	Óleo Fula Puro Girassol	OLFPG



**Tabela 3.2:** Propriedades físico-químicas das amostras de azeite conforme a informação fornecida no rótulo.

Propriedades físico-químicas	GLCLVE	GLSUVE	OLSVE	GLSBRV	OLSRV	SOSPBRV
Acidez (%)	≤0,7	≤0,7	≤0,7	≤1,0	≤1,0	*
Índice de Peróxidos (mEqO <sub>2</sub> /kg)	≤20	≤20	≤20	≤15	≤15	*
K <sub>270</sub>	≤0,22	≤0,22	≤0,22	≤0,90	≤0,90	*
K <sub>232</sub>	≤2,50	≤2,50	≤2,50	*	*	*
Ceras (mg/kg)	≤150	≤150	≤150	≤350	≤350	*
ΔK	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,15	≤0,15	*

\*) Sem informação no rótulo.

Na Tabela 3.3, apresentam-se as características físico-químicas dos óleos, também de acordo com a informação fornecida no rótulo. Os dois óleos diferem muito em termos de composição, sendo que o OLFPa apresenta um alto teor em ácidos gordos monoinsaturados.

**Tabela 3.3:** Descrição das propriedades físico-químicas dos óleos vegetais, conforme a informação disponível no rótulo.

Propriedades físico-químicas	Por 100 mL	
	OLFPA	OLFPG
Energia	3374 kJ/821 kcal	3397 kJ/826 kcal
Lípidos	91 g	92 g
dos quais:		
Ácidos gordos saturados	16 g	10 g
Ácidos gordos monoinsaturados	61 g	28 g
Ácidos gordos polinsaturados	15 g	53 g
Hidratos de carbono	0g	0g
dos quais:		
Açúcares	0 g	0 g
Proteínas	0g	0 g
Sal	0 g	0g

Para classificar os vários azeites foram retirados 5 mL de cada um com o auxílio de uma micropipeta e, posteriormente, foram caracterizados assim como retirados das respetivas garrafas. Realizou-se a caracterização dos azeites com recurso às técnicas de espectrofotometria de Ultravioleta-Visível, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e por espectroscopia de impedância. Posteriormente, aos resultados recolhidos foram aplicados o método estatístico PCA para a classificação e interpretação dos mesmos.

Para avaliar azeite adulterado, foram preparadas misturas de OLSVE com OLFPA e OLFPG, conforme as quantidades indicadas na Tabela 3.4, cuja quantidade de azeite decresce à medida que se aumenta a quantidade de óleo. Para cada mistura é apresentada duas nomenclaturas e usar-se-ão as duas neste trabalho. As misturas são realizadas de forma idêntica, por isso apenas apresenta-se o rácio de OLSVE com OLFPA. A nomenclatura (1\_A; 0,8\_A; 0,6\_A; 0,4\_A; 0,2\_A e 0\_A) refere-se à mistura OLSVE com o OLFPA e a outra, evidentemente, corresponde à mistura de OLSVE com OLFPG. A fim de obter uma melhor homogeneização das misturas, foi utilizado um agitador magnético durante 10 minutos com uma velocidade de rotação de 700 rpm. As misturas foram avaliadas por espectroscopia de impedância e, posteriormente, aplicou-se a PCA para a redução da dimensionalidade e extração das informações mais relevantes.

**Tabela 3.4:** Descrição das quantidades de mistura de OLSVE com o OLFPA e OLFPG e a nomenclatura usada.

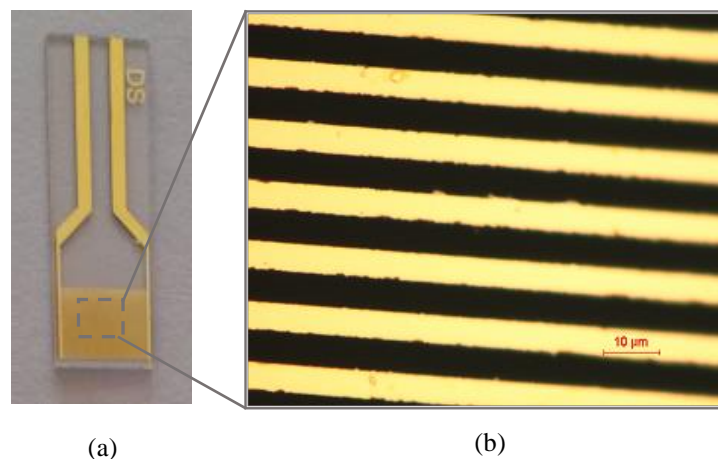
Misturas	Rácio de azeite	Outra nomenclatura	
	5mL_OLSVE_puro	1_A	1_G
<b>OLSVE + OLFPA</b>	4mL_OLSVE + 1mL_OLFPA	0,8_A	0,8_G
	3mL_OLSVE + 2mL_OLFPA	0,6_A	0,6_G
	2mL_OLSVE + 3mL_OLFPA	0,4_A	0,4_G
<b>OLSVE + OLFPG</b>	1mL_OLSVE + 4mL_OLFPA	0,2_A	0,2_G
	5mL_OLFPA_puro	0_A	0_G

## 3.2 Sensores

### 3.2.1 Características dos sensores interdigitados de ouro

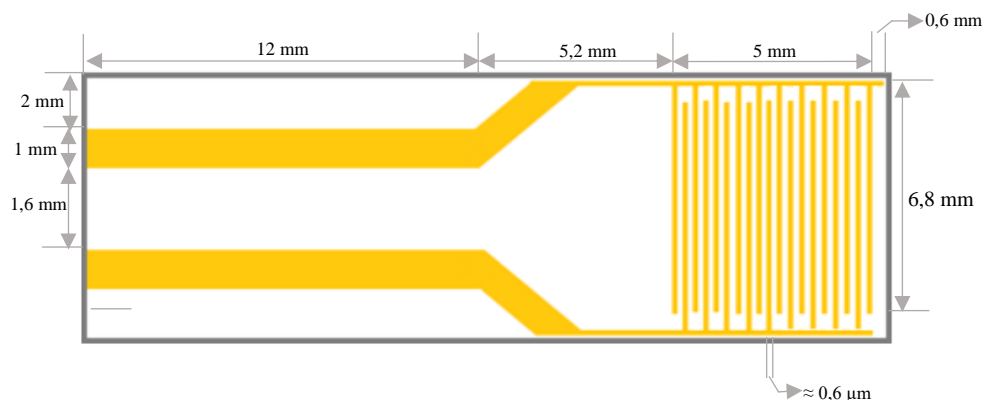
O sensor interdigitado capacitivo utilizado é composto por duas bandas de ligação e cada uma constituída por 250 elétrodos interdigitados, preparados a partir da deposição do ouro (Au) somente num dos lados de um substrato sólido de vidro BK7 (refere-se ao vidro de borosilicato-

óxido de boro e sílica). A Figura 3.2 (a) corresponde a uma fotografia do sensor e a Figura 3.2 (b) representa uma imagem ótica dos seus elétrodos interdigitados obtida no microscópio da marca *Nikon*, modelo *Eclipse LV100* de luz não polarizada. Segundo o fabricante, os substratos onde foram depositados os elétrodos de ouro tem a dimensão de 22,8 x 7,6 x 0,7 mm. Para além de permitirem trabalhar com baixos volumes de amostra, aumentam os limites de sensibilidade de deteção e são apropriados no desenvolvimento de biossensores. Estes sensores foram adquiridos à *DROPSENS* e após a aquisição foram mantidos a temperatura ambiente em lugar seco.



**Figura 3.2:** Fotografia do sensor interdigitado de ouro usado em (a) e de uma imagem ampliada (100x) que mostra uma região dos seus elétrodos em (b). Esta imagem é obtida através do microscópio ótico.

Como mencionado no capítulo anterior, as características dos elétrodos interdigitados afetam na sensibilidade do sensor. Assim, a Figura 3.3 representa o sensor interdigitado com a dimensão dos seus elétrodos. O sensor foi imerso nas soluções com o apoio de uma pinça pela região não condutora.



**Figura 3.3:** Representação esquemática do sensor interdigitado com a dimensão dos seus elétrodos.

### 3.2.2 Materiais para a produção de camadas sensoriais

Para melhorar a sensibilidade dos sensores interdigitados, produziu-se sobre estes dispositivos filmes finos baseados nos seguintes compostos:

- **PAZO**

O poli(1-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo) - benzenesulfonamida)-1,2-etanodiil), sal de sódio), denominado PAZO, consiste numa cadeia polimérica com os grupos cromóforos ligados à cadeia principal, isto é, como ramificação lateral da cadeia. Este grupo cromóforo pertence ao grupo dos azobenzenos com uma ligação N=N entre dois anéis aromáticos que atribuem ao composto uma coloração alaranjada. Num dos anéis encontra-se ligado o grupo iónico,  $\text{COO}^-$  e respetivo contraíão  $\text{Na}^+$ . Este grupo iónico permite a dissolução deste polímero em meios aquosos, isto é, que seja classificado de um polieletrólito [44]. A sua estrutura molecular encontra-se representada na Figura 3.4 (a).

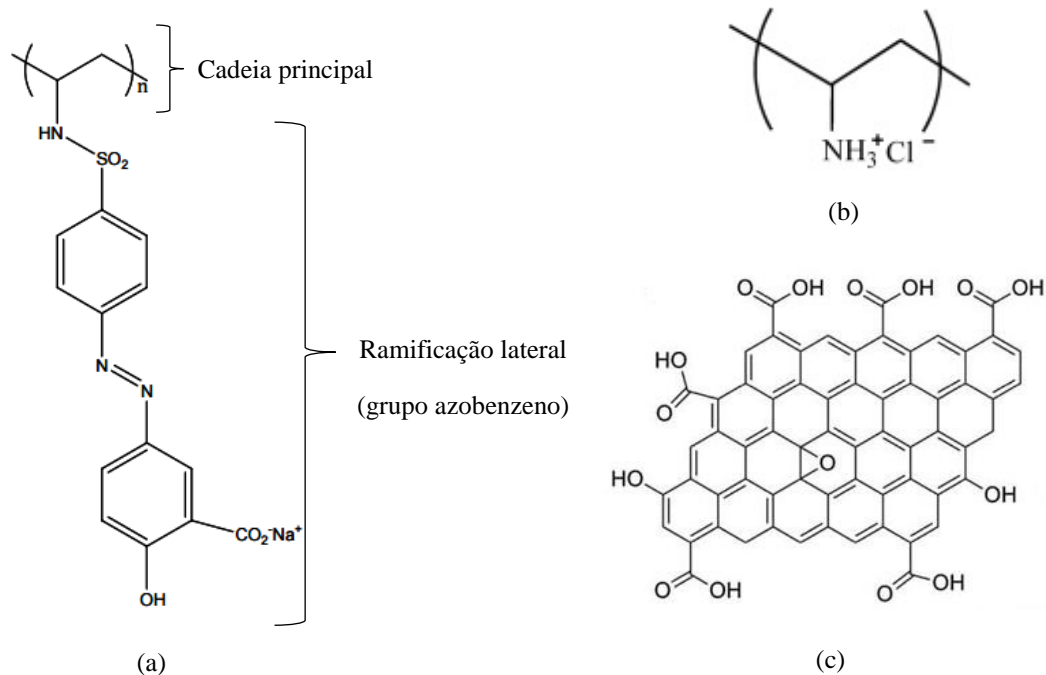
- **PAH**

O poli(hidrocloreto de alilamina), denominado PAH, é um polieletrólito catiónico composto por uma cadeia de monómero que possui um grupo iónico  $\text{NH}_3^+$  como radical ligado a um contraíão  $\text{Cl}^-$ . O PAH foi escolhido porque possui carga elétrica positiva que permite o processo de construção de bicamadas através da interação iónica com outro composto de carga negativa. A escolha de ambos os compostos descritos, foi influenciada pelo conhecimento adquirido num estudo anterior [44] realizado pelo grupo de Sistemas Moleculares Funcionais do CEFITEC que caracterizou os processos de adsorção e as constantes de tempo necessárias para a formação de filmes finos. A estrutura molecular do PAH encontra-se representada na Figura 3.4 (b)

- **GO**

O óxido de grafeno (GO, do inglês, *Graphene Oxide*) é proveniente da esfoliação do grafite devido às reações de oxidação. A estrutura do GO não é bem definida, pois o material apresenta uma composição que pode ser influenciada pelo método de síntese ou grau de oxidação [45]. O GO consiste numa estrutura hexagonal de carbonos tanto com hibridização  $\text{sp}^2$  como  $\text{sp}^3$ , bem como diversos grupos funcionais, tais como o epóxido e hidroxila e as suas bordas são compostas, principalmente, por grupos carbonila e carboxila [46]. O GO tem despertado grande interesse devido às suas excelentes propriedades elétricas, mecânicas e térmicas, como também por ser considerado um bom condutor [47]. Na Figura 3.4 (c) apresenta-se um modelo da sua estrutura molecular.

Todos os compostos acima descritos foram adquiridos à *Sigma Aldrich*, cuja utilização se deu da mesma forma como foram recebidos. O PAZO e o PAH são compostos classificados como sendo tóxicos e irritantes e, como tal, requerem uma manipulação segura. O GO não é considerado um produto tóxico, no entanto, para um manuseamento seguro, apresenta-se no anexo deste trabalho a ficha de segurança destes compostos.



**Figura 3.4:** Representação esquemática da estrutura molecular dos polieletrólitos (a) poli(1-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilazo)-benzenesulfonamida)-1,2-etanodiil, sal de sódio) (PAZO) [48], (b) poli(hidrocloreto de alimanina) (PAH) [49] e (c) óxido de grafeno (GO) [47].

### 3.2.2.1 Preparação de soluções e construção de filmes finos

As soluções foram preparadas em balões volumétricos que previamente foram limpos com uma solução piranha composta pela mistura de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com a proporção de 1:1 durante 10 minutos para a remoção de resíduos de impurezas orgânicas e inorgânicas. Posteriormente, os balões volumétricos foram enxaguados abundantemente com água ultrapura por um sistema da *Millipore* que produz água padrão do tipo *Milli-Q*. Por fim, foram secos com azoto. A água *Milli-Q* apresenta uma resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .

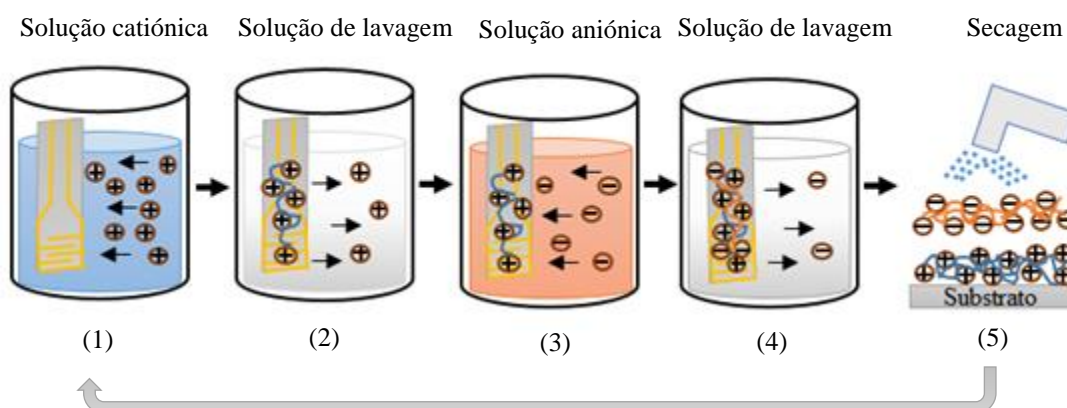
As soluções aquosas de PAZO, PAH e de GO foram preparadas de forma que a sua concentração fosse de  $10^{-2} \text{ M}$ . A massa molar do PAZO é  $369,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e do PAH é  $93,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Deste modo, para 50 mL de solução aquosa foram adicionados 0,18 g de PAZO e 0,049 g de PAH, a 50 mL de água *Milli-Q*. O GO adquirido é disperso em água e foram usados 4 mL para

50 mL de água.

A técnica escolhida para a produção das camadas sobre o sensor é denominada camada-sobre-camada (LbL, do inglês, *Layer-by-Layer*) e tem sido extensivamente utilizada não apenas devido ao seu baixo valor económico e simplicidade, mas também porque permite controlar a estrutura e a espessura do filme. Este método desenvolvido por Decher e colaboradores consiste na fabricação de filmes finos através da deposição de polieletrólitos de cargas moleculares opostas, a partir de soluções aquosas com passos de lavagem entre as soluções [49]. Neste processo pretende-se que as monocamadas aderem-se entre si por meio de forças eletrostáticas intermoleculares [49], [50]. Os sensores interdigitados de ouro serviram de substrato sólido, nos quais foram adsorvidos os compostos que formam as bicamadas dos filmes finos produzidos pela técnica LbL. Para a elaboração das bicamadas foram escolhidas as combinações de  $(\text{PAH/PAZO})_n$  e de  $(\text{PAH/GO})_n$ , onde os elementos entre parêntesis referem-se a cada um dos componentes presentes nas bicamadas. O primeiro composto é catiónico e o segundo corresponde ao de carga oposta, sendo o índice (n) a indicação do número de bicamadas. Os filmes de  $(\text{PAH/PAZO})_n$  e  $(\text{PAH/GO})_n$  foram preparados conforme as seguintes etapas:

- I. Imergir o substrato numa solução catiónica (solução aquosa com um polieletrólito carregado positivamente que, neste caso, é o polieletrólito PAH) durante o tempo de adsorção de 1 min que é um intervalo de tempo razoável para ocorrer a adsorção sobre o substrato.
- II. Seguidamente, o substrato é imerso na solução de lavagem composta por água *Milli-Q* para remover material não adsorvido.
- III. Posteriormente, o sensor com uma monocamada adsorvida é introduzido numa solução aniónica (polieletrólito carregado negativamente que, neste caso, incluem o PAZO e o GO) durante o tempo de adsorção de 1 min.
- IV. Novamente, é necessário uma etapa de lavagem e no fim de cada bicamada pode ser efetuada uma secagem natural ou uma secagem forçada do substrato com azoto. A segunda opção foi a escolhida para este trabalho.

As etapas descritas acima podem ser repetidas várias vezes. Para o presente trabalho, o processo foi repetido cinco vezes, quer na combinação de  $(\text{PAH/PAZO})_5$  quer na combinação de  $(\text{PAH/GO})_5$ . Os filmes produzidos foram usados na análise da mistura de OLSVE com o OLFPA. Para cada quantidade de mistura, desde o menor para o maior rácio de azeite, efetuada conforme mas quantidades mostradas na Tabela 3.4, foi produzido um sensor com adsorção de filmes e, consequentemente, uma nova solução, a fim de evitar a contaminação das amostras. As etapas fundamentais para a construção de filmes finos encontram-se representadas na Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Representação esquemática do procedimento experimental de produção de filmes finos pela técnica LbL que indica as etapas: (1) representação da adsorção de um polieletrólito catiônico no substrato (sensor interdigitado de ouro) com o tempo de imersão de 1 minuto; (2) processo de lavagem do substrato com uma camada de um polieletrólito catiônico na solução de lavagem; (3) representação da adsorção de uma camada de um polieletrólito aniônico com tempo de imersão de 1 minuto; (4) processo de lavagem da bicamada dos polieletrólitos catiônico e aniônico na solução de lavagem e (5) secagem de uma bicamada com azoto e de um substrato composto com as camadas alternadas de polímeros catiônicos e aniônicos.

### 3.3 Técnicas de caracterização das amostras

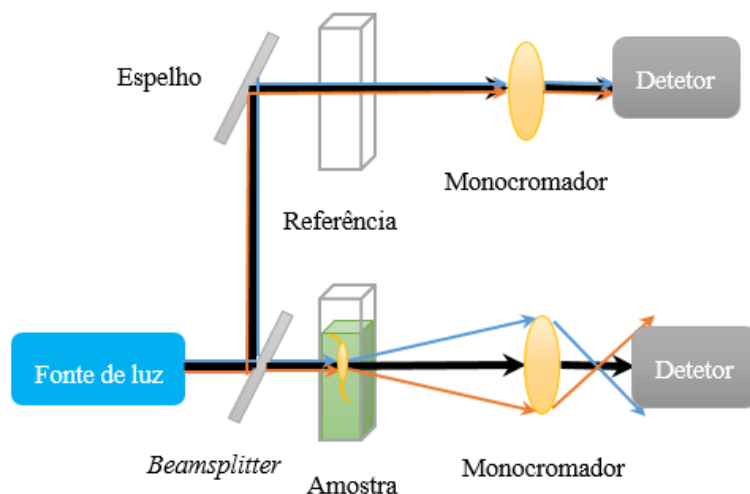
#### 3.3.1 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) é uma técnica de caracterização de amostras não destrutiva de grande interesse que compreende uma gama de comprimentos de onda entre 200 nm e 900 nm. Pretende-se, através desta técnica, caracterizar a absorvância (propriedade que representa a fração de luz absorvida pela amostra) dos azeites e dos óleos. A informação foi recolhida no intervalo compreendido entre 300 nm e 700 nm de comprimento de onda. Esta região foi escolhida para a obtenção dos espectros porque é neste intervalo de comprimento de onda que se encontram as informações relevantes e discriminantes. A aquisição dos espectros realizou-se com recurso ao espectrofotómetro de duplo feixe da marca *Shimadzu*, modelo *UV-2101 PC* que pertence ao Laboratório do Centro de Física e Investigação Tecnológica (CEFITEC) e possui uma resolução de 0,5 nm.

A fonte de radiação de um espectrofotómetro UV-Vis é composta pela combinação de uma lâmpada de deutério que cobre o intervalo de comprimento de onda ultravioleta (entre 160 nm e 375 nm) e outra lâmpada de tungsténio-halogénio que cobre a região de comprimento de onda do visível e do infravermelho próximo (entre 350 nm e 2500 nm). A análise na região do ultravioleta obstrói-se a lâmpada de tungsténio-halogénio e na região do visível a lâmpada de deutério.

Os componentes básicos de um espectrofotômetro de duplo feixe são: uma fonte de radiação; um monocromador; um sistema ótico composto por espelhos; um fotodetetor e um conversor analógico-digital. É colocado à saída da fonte de radiação um monocromador para que todos os comprimentos de onda sejam varridos. O monocromador restringe todos os comprimentos de onda à exceção de um, de forma que a radiação incidente quer na amostra quer no substrato de referência seja monocromática. O feixe é direcionado para um componente ótico que decompõe o feixe incidente em dois (*beamsplitter*), refletindo 50% do feixe incidente e transmitindo o restante. O feixe refletido incidirá na referência e o feixe transmitido alcançará a amostra em estudo. Os dois feixes incidem no detetor através de um conjunto de reflexões por intermédio de um grupo de espelhos. A escolha do detetor é automatizada e depende da região do espectro que é varrida. Para a região do ultravioleta e do visível utiliza-se um fotomultiplicador e para a região do infravermelho próximo utiliza-se um detetor de sulfeto de chumbo (PbS). O sinal é convertido de analógico para digital e, por meio de uma placa de aquisição de dados e *software* apropriado, são efetuados as medições de absorvância, transmitância e refletância [48].

Para analisar as amostras, foram utilizadas duas cubetas de quartzo com 1 cm de percurso ótico, tendo como referência uma cubeta do mesmo tipo que se encontrava vazia. A Figura 3.6 ilustra um esquema parcial do sistema ótico de um espectrofotômetro de duplo feixe.



**Figura 3.6:** Esquema representativo de um sistema ótico de um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe.

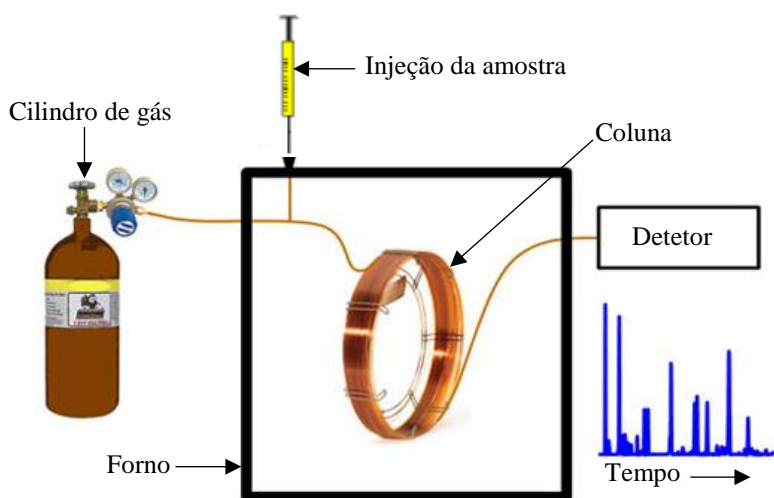
### 3.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

A combinação da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS, do inglês, *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*) com a prévia extração através da micro extração de fase sólida (SPME, do inglês, *Solid Phase Micro-Extraction*) permitiu avaliar



os compostos voláteis dos azeites e dos óleos vegetais. A cromatografia gasosa consiste na separação de componentes vaporizados, sendo a volatilização dos compostos quando estes são aquecidos o seu principal conceito. Assim, esta metodologia pode ser usada para compostos voláteis. A fase móvel é um gás (hélio, hidrogênio ou azoto), enquanto a fase estacionária é um polímero que reveste a parede interna da coluna de metal ou de vidro, a qual é colocada dentro do forno do cromatógrafo, onde a temperatura é termostaticamente controlada. A fase estacionária retarda a movimentação dos compostos da amostra injetada ao longo da coluna. A interação entre os componentes da amostra e a fase estacionária varia em função das propriedades das substâncias analisadas. Quando a energia da interação “substância-fase estacionária” difere significativamente para dois compostos, um é retido por mais tempo que o outro. O tempo em que são retidos na coluna é denominado tempo de retenção ( $T_r$ ) e é a medida desta interação.

No cromatógrafo, a amostra é introduzida no injetor ligado à coluna analítica com o auxílio de uma seringa, sendo arrastada pela fase móvel ao longo da fase estacionária. A coluna se encontra, normalmente, a uma temperatura inicial muito mais reduzida que o injetor e com a passagem dos componentes volatilizados pela coluna, ocorre a partição entre a fase estacionária e a fase móvel. A Figura 3.7 representa um esquema básico dos elementos que compõem um aparelho GC.



**Figura 3.7:** Configuração básica de um instrumento GC com a sua constituição principal: cilindro de gás de arraste, forno, seringa para a injeção da amostra, coluna e detetor [51].

Os diversos componentes da amostra são separados pela aplicação de um programa de rampas de temperatura. Os componentes vaporizados saem da coluna na ordem inversa da sua afinidade pela fase estacionária, isto é, os componentes com alta afinidade pela fase estacionária são os

últimos a deixar a coluna. No espectrómetro de massa, os componentes oriundos da coluna cromatográfica são convertidos em iões, separados em função da sua razão massa/carga ( $m/z$ ), seguido da sua deteção [52], [53].

A viabilização da análise por GC depende de um método adequado de preparação da amostra, como por exemplo, a SPME que consiste numa fibra revestida com um polímero de um sólido adsorvente ou uma combinação de ambos. A SPME não compromete a análise química, não utiliza solventes, possui sensibilidade e reprodutibilidade elevada e simplifica o transporte do material extraído para o cromatógrafo. Esta técnica baseia-se em mecanismos de adsorção e dessorção e processa-se da seguinte forma: após a fibra ser exposta ao *headspace* do vial, os compostos voláteis são capturados, isto é, a fibra é estendida até a fase gasosa acima da amostra líquida ou sólida. Posteriormente, a fibra é recolhida e a agulha é retirada do vial. Para a dessorção, a fibra é inserida no injetor do GC, onde os compostos voláteis são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica. [54], [55].

- **Preparação das amostras**

Para a extração foi utilizada uma fibra SPME tripla *Supelco* com o comprimento de 1 cm e revestida com as combinações de carboxeno, divinilbenzeno e de polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS) que é muito utilizada em compostos voláteis. A amostra de azeite foi colocada num vial de 22 mL e foi deixada durante 10 minutos a 50 °C para permitir o equilíbrio dos produtos voláteis no topo do vial. Após o tempo de equilíbrio, o septo que cobre o frasco foi perfurado com uma agulha e a fibra de SPME foi exposta ao espaço superior durante 50 min. Estas operações são realizadas com o auxílio de um braço mecânico automatizado da *Combi PAL Auto Sampler CTC Analytics*.

- **Análise por GC-MS**

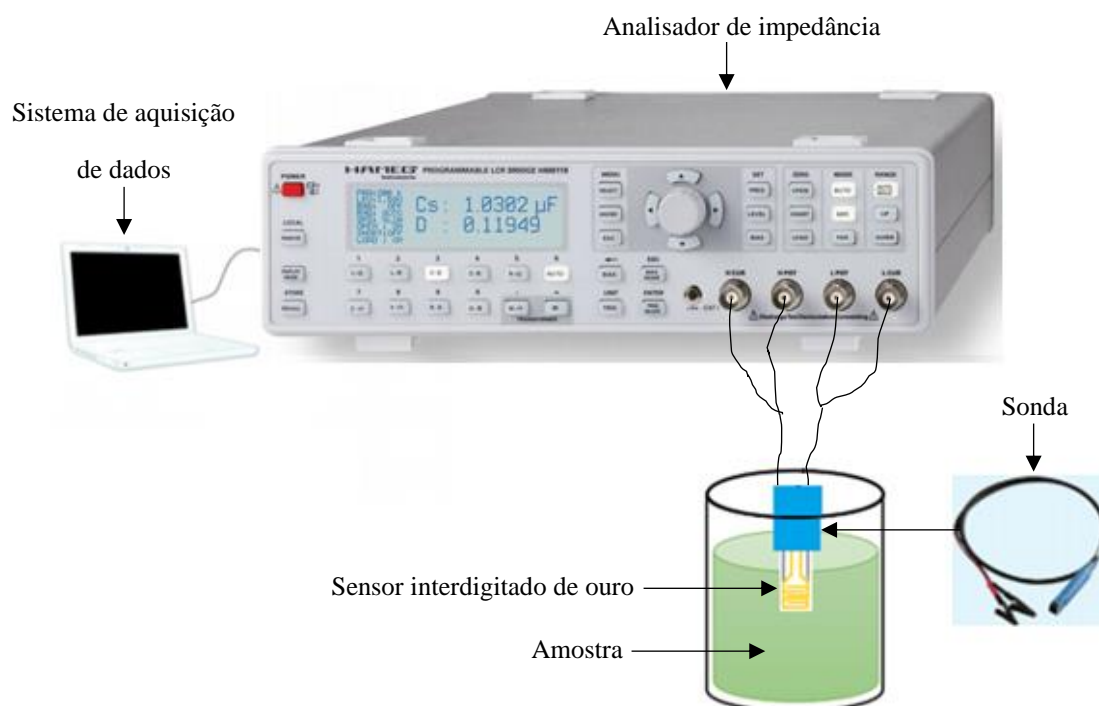
Após a preparação da amostra os voláteis adsorvidos pela fibra foram termicamente dessorvidos no injetor de um cromatógrafo gasoso *Scion 456 Bruker* acoplado a um espectrómetro de massa triplo Quadrupolo *Bruker* (modo *splitless*). As análises foram realizadas em duas colunas *Durabond* (DB-WAX e DB-5) de dimensões (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura do forno foi mantida a 40 °C e, seguidamente, programada para um gradiente de temperatura de 4 °C/minuto até aos 240 °C. O espectrómetro de massa utilizado operou com a temperatura de linha de transferência a 240 °C e da fonte de iões a 220 °C e com um intervalo de varrimento de massa entre 40  $m/z$  aos 450  $m/z$ . Os compostos foram identificados por comparação com padrões previamente existentes. A análise dos azeites e dos óleos por GC-MS foi realizada no equipamento de cromatografia gasosa pertencente ao Departamento de Química da FCT/UNL.

### 3.3.3 Espetroscopia de impedância

#### 3.3.3.1 Composição da língua eletrônica

Os elementos principais da LE desenvolvida compreendem um analisador de impedância, um computador munido de um programa de aquisição de dados, sensores interdigitados de ouro e sensores interdigitados revestidos com filmes finos. A Figura 3.8 ilustra o sistema usado para medir a impedância elétricas das amostras. Os espectros de impedância foram obtidos por meio de medições com um analisador de impedância da marca alemã *HAMEG Programmable LCR Bridge*, modelo *HM 8118*. Este aparelho cobre uma gama de frequências de medição que situa no intervalo entre 20 Hz e 200 KHz e é constituído por duas pontas de prova, através das quais foi estabelecida uma tensão alternada com forma sinusoidal de 1 V de amplitude. Estas pontas de prova são ligadas à uma sonda que serve para acoplar o sensor interdigitado. O analisador de impedância possui também um cabo de interface *USB* que permite a sua ligação com um computador.

O princípio de funcionamento do analisador de impedância depende da variante do sistema que se tem ligado a este aparelho e baseia-se num circuito equivalente Resistência-Condensador (RC) ou Resistência-Bobina (RL) em série ou em paralelo. Neste caso, o sensor interdigitado que é imerso nas amostras apresenta um circuito RC em paralelo que se comprova a partir do momento em que o sensor é acoplado à sonda que liga às pontas de prova do analisador, pois este em modo automático devolve uma função PAR (paralelo). Antes da realização de qualquer medição elétrica realiza-se a calibração do analisador em circuito aberto e em circuito fechado, sendo esta uma operação importante porque permite minimizar a incerteza associada às medições. Assim, para a calibração em circuito aberto, as pontas de prova devem estar afastadas uma da outra, enquanto na calibração em circuito fechado estas devem manter-se em contacto. Após a ligação do cabo *USB* ao analisador, os cabos de medição conectam-se às pontas de prova da uma sonda. Posteriormente, a sonda com o sensor é introduzida numa proveta que contém a amostra que se pretende analisar com o auxílio de um suporte que estabilize os cabos de ligação.



**Figura 3.8:** Esquema ilustrativo do sistema experimental que compreende o analisador de impedância HA-MEG 8118, o sistema de aquisição de dados, o sensor interdigitado imerso numa amostra e a sonda que permite acoplar o sensor.

As análises foram realizadas com a temperatura controlada por intermédio de um banho termostático a temperatura de 25 °C. Foi necessário esperar um período de estabilização do sinal de 20 minutos. Nos ensaios em que o sensor não se encontrava revestido com as bicamadas, realizou-se lavagens após cada análise de uma amostra. Para este efeito, foi utilizado um banho de ultrassons a temperatura de 50 °C durante 7 minutos numa solução de Mucosol 2%, mantendo a integridade do sensor. De seguida, foi enxaguado com água *Milli-Q*, etanol e, novamente, com água *Milli-Q*. Finalmente, foi seco com azoto.

### 3.3.3.2 Automatização do sistema de aquisição de dados

A recolha de dados espectrais de impedância eléctrica neste trabalho é intensa, assim, torna-se útil automatizar e controlar o processo de aquisição de dados que é conseguida ao estabelecer a comunicação entre um computador e o analisador de impedância. Na recolha manual, o utilizador define os parâmetros do sinal eléctrico a aplicar, tais como a amplitude da tensão eléctrica, a forma de onda e a frequência, e selecciona as componentes de impedância que se pretende medir. Após estabelecer a ligação entre os contactos do analisador e a amostra, cuja impedância se pretende medir, o utilizador efetua o registo de cada valor mostrado no ecrã do analisador, ao mesmo

tempo que faz a variação da frequência dentro da gama de funcionamento do aparelho. A recolha referida, aqui, caracteriza-se de uma forma lenta.

A automatização da recolha de dados requer a utilização de algumas ferramentas informáticas disponíveis, tais como o *Hyperterminal* do *Windows*, o *Labview* da *National Instruments* e o programa de aquisição de dados “*HAMEG HM8118 C-R Acquisition*”. Este último foi desenvolvido, especialmente, para o analisador por Rui Pimentel na plataforma *Labview* na sua Tese de Mestrado [38]. Apesar de o programa estar apto para ser utilizado, a sua instalação requer a compreensão de como os dados são recebidos e enviados pelo analisador de impedância.

O manual de instrução que acompanha o analisador oferece um conjunto de comandos de controlo que permite ao utilizador a definição remota dos parâmetros de medição entre outras funcionalidades próprias do aparelho. Como já se referiu anteriormente, o contacto físico entre o analisador e o computador foi efetuado por meio de um cabo de interface *USB*. O analisador só é reconhecido pelo computador após a instalação do *driver* HO820. É indispensável simular um porto um porto de comunicação que é também denominado porto série. Este procedimento permite emular a comunicação *USB* como se fosse uma comunicação RS232. Isto é, permite estabelecer a comunicação entre o computador e o analisador pelas suas especificações. Com o *Hyperterminal* foi possível realizar a configuração do porto de comunicação como está estabelecido no manual de instruções e permitiu testar os comandos de forma a obter a resposta do analisador. Desta forma, é possível verificar a ligação que permite efetuar atribuições aos comandos e verificar se o valor é alterado no ecrã do analisador. Após realizar a comunicação, o programa *HAMEG HM8118 C-R Acquisition* está pronto para a configuração remota dos parâmetros de análise de impedância. O programa fixa um valor de tensão, define a aquisição dos parâmetros capacidade e resistência ao mesmo tempo que define um valor de frequência. O analisador calcula os valores da capacidade e de resistência do sistema sensor-líquido a partir da sua resposta elétrica ao sinal que lhe é imposto em cada momento. A informação é transferida para um computador e guardados num ficheiro *.txt* no ambiente de trabalho, sendo posteriormente tratados no *OriginPro-9.0*.

### **3.4 Análise estatística**

A análise estatística foi efetuada no *software XLSTAT-2014* que oferece várias ferramentas de análise estatística, incluindo o método multivariado PCA.





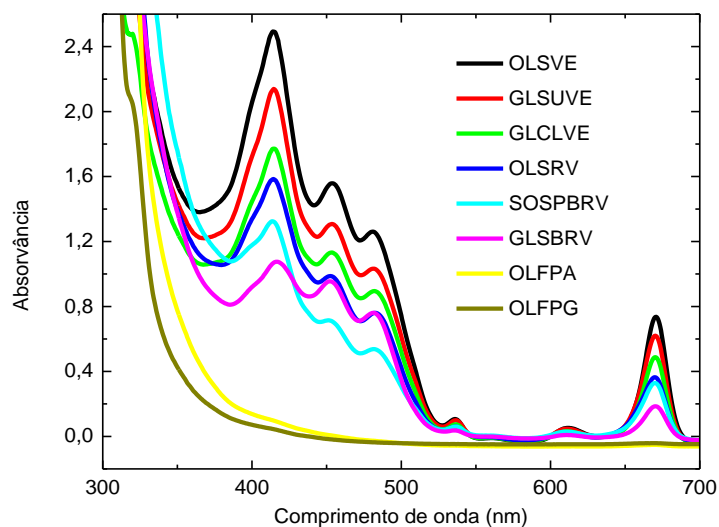
## **Resultados e Discussão**

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos por aplicação das várias técnicas descritas nos capítulos anteriores que permitem caracterizar os diferentes tipos de azeite e discriminar as misturas de OLSVE com OLFPa e OLFPg. Estes resultados foram submetidos à uma análise estatística através da aplicação da PCA, sendo os resultados desta análise apresentados também neste capítulo.

### **4.1 Caracterização de azeites**

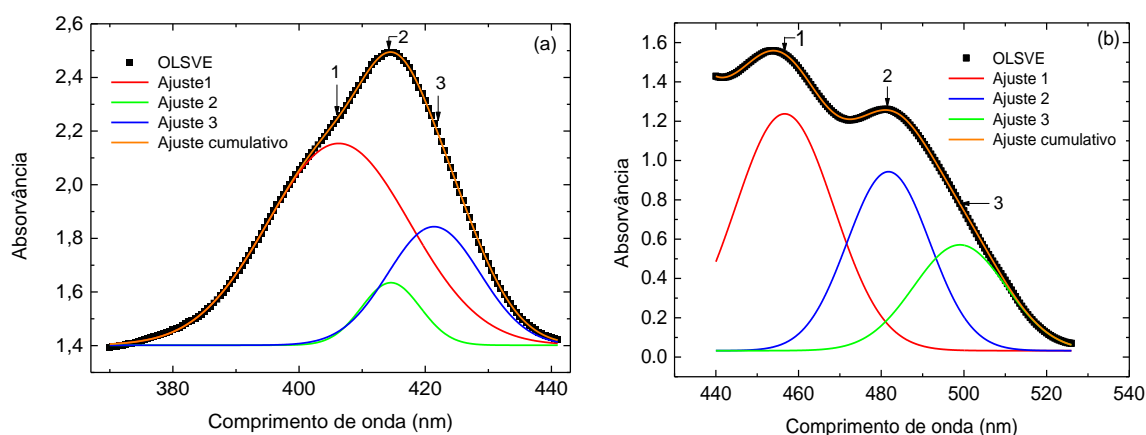
#### **4.1.1 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível**

A UV-Vis permitiu obter os espectros de absorvância das amostras de azeite e dos óleos. Como se pode observar na Figura 4.1, o OLSVE, o GLSUVE e o GLCLVE formam o grupo de AVE que apresenta intensidades das bandas de absorção superiores. O OLSVE destaca-se, pois é o azeite que apresenta valores superiores de absorção da radiação eletromagnética. O grupo de ARV constituído por OLSRV, SOSPBRV e por GLSBRV apresenta valores de absorvância inferiores. Contudo, os diferentes tipos de azeite apresentam espectros de absorção semelhantes. O OLFPa e o OLFPg apresentam espectros distintos relativamente aos espectros dos azeites e apresentam absorvância apenas para comprimentos de onda mais baixos, neste caso, abaixo dos 330 nm. O OLFPa apresenta valores de absorção superiores relativamente ao OLFPg.

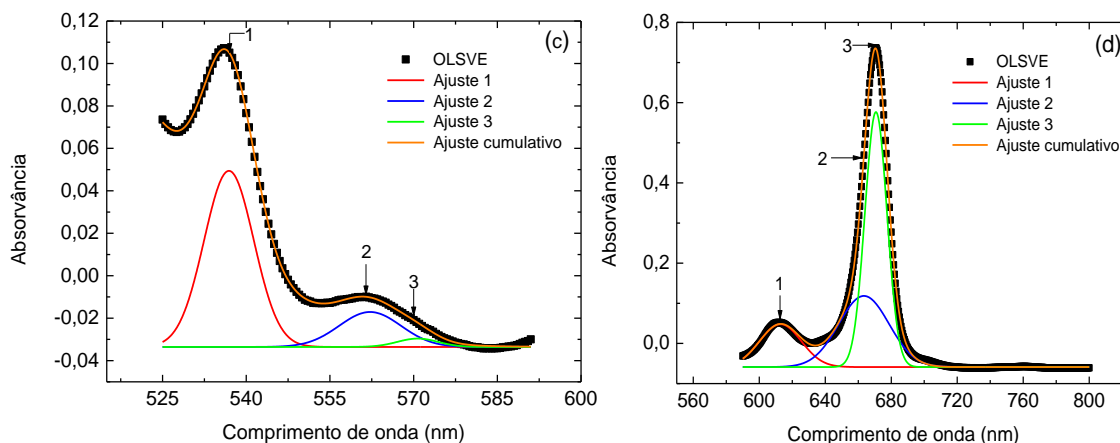


**Figura 4.1:** Espectros de absorção dos AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE), dos ARV (OLSRV, SOSPBVRV e GLSBRV) e dos óleos (OLFPA e OLFPG) obtidos por UV-Vis na gama de comprimento de onda entre 300 nm e 700 nm.

Os espectros dos azeites estão de acordo com os resultados de um estudo [8] em que a gama correspondente ao comprimento de onda entre 450 nm e 520 nm é atribuído à absorção de pigmentos carotenoides e o intervalo compreendido entre 380 nm e 450 nm corresponde a sobreposição da banda de carotenoides com a absorção da clorofila. A banda característica situada na região entre 650 nm e 700 nm é originada, exclusivamente, devido à absorção de clorofilas. Como o resultado anterior demonstra que os seis azeites apresentam espectros semelhantes e com várias bandas de absorção, optou-se por estudar com maior detalhe por meio da adaptação de funções gaussianas ao espectro do azeite OLSVE. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4.2.







**Figura 4.2:** Espectro de absorção do azeite OLSVE obtido por UV-Vis em (a), (b), (c) e (d). As linhas a vermelho, azul e verde em (a), (b), (c) e (d) correspondem ao ajuste das bandas por funções gaussianas.

A Tabela 4.1 contém os parâmetros resultantes dos ajustes com curvas gaussianas. Os espectros de todos os azeites mostram uma ampla zona de absorção entre 360 nm e 525 nm com três máximos bem definidos na vizinhança de 414,6 nm, 456,6 nm e 481,7 nm e uma banda mais ou menos intensa em 670,7 nm.

**Tabela 4.1:** Parâmetros dos ajustes com curvas gaussianas do espectro de absorção de OLSVE obtido por UV-Vis.

Espectros	Nº de banda	Posição da banda (nm)	Largura a meia altura
(a)	1	406,3 ± 0,3	26,6 ± 0,3
	2	414,6 ± 0,1	10,9 ± 0,5
	3	421,4 ± 0,8	17,2 ± 0,7
(b)	1	457 ± 3	28 ± 9
	2	481,7 ± 0,4	23,5 ± 1
	3	499 ± 2	26 ± 2
(c)	1	536,9 ± 0,3	10,5 ± 0,1
	2	562,1 ± 0,6	13 ± 2
	3	570,7 ± 1	9 ± 2
(d)	1	612,8 ± 0,2	29,7 ± 0,4
	2	663,4 ± 0,2	35,9 ± 0,4
	3	670,7 ± 0,2	15,70 ± 0,07

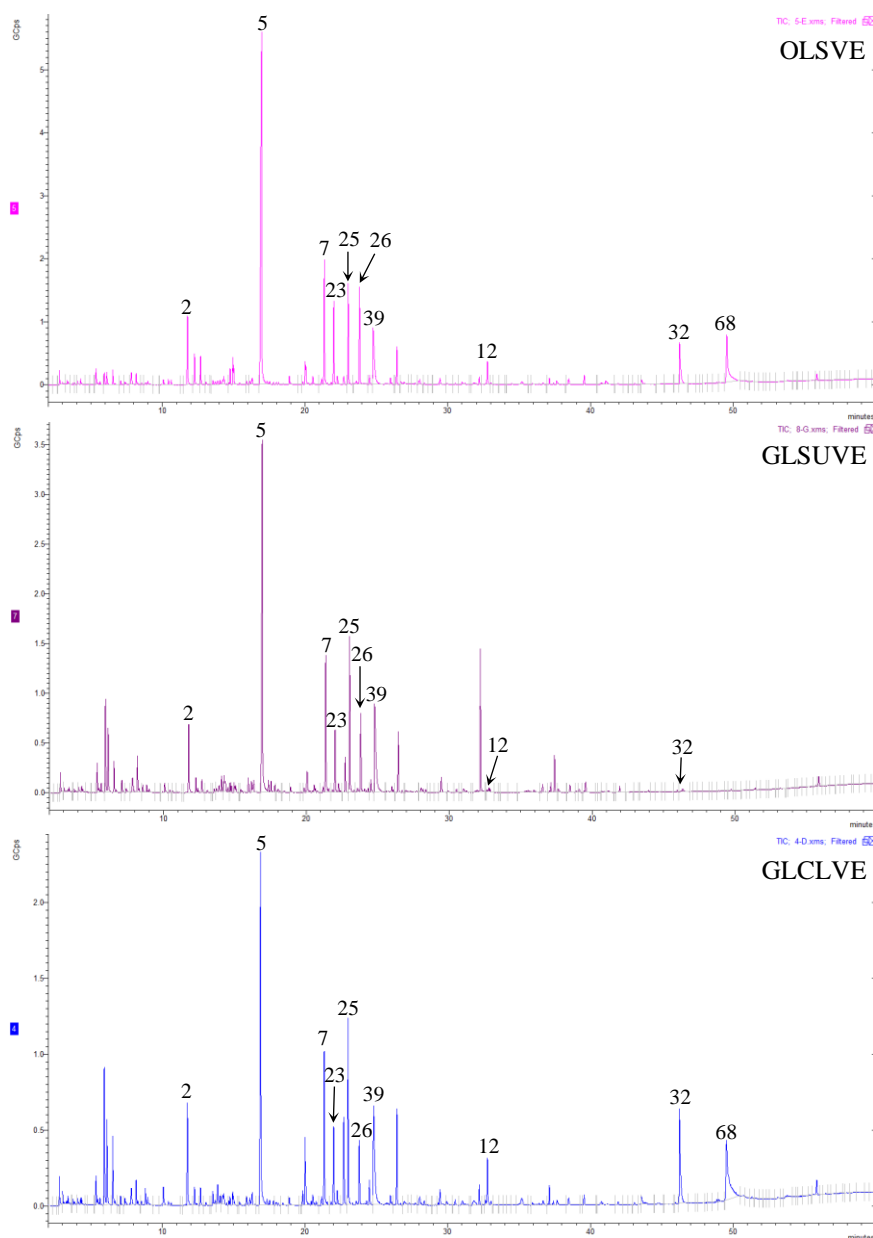
Alguns pigmentos da categoria de ARV são removidos ou sofrem degradação durante o processo de refinação, portanto supõe-se que este poderá ser um dos fatores para a explicação do resultado obtido. Neste estudo [8], os autores revelam que a fraca composição em pigmentos é característica dos ARV, assim, este tipo de azeite pode ser diferenciado do AVE com base na sua cor. No entanto, o teor de pigmentos no azeite é determinado por vários fatores, tais como a variedade da azeitona, a maturação e as áreas geográficas. Assim sendo, apesar das diferenças verificadas na absorção dos AVE e dos ARV que permitam a sua discriminação, os fatores referidos podem restringir o uso da UV-Vis na diferenciação de azeite.

#### **4.1.2 Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa**

Nas Figuras 4.3 e 4.4, apresentam-se os cromatogramas dos AVE, dos ARV e dos óleos obtidos por GC-MS que revelaram a presença de 68 compostos. Foram detetados alguns compostos da fração minoritária que atribuem ao azeite características consideradas positivas ou negativas. Os compostos detetados incluem aldeídos, cetonas, álcoois, esterres, ácidos e hidrocarbonetos.

Os cromatogramas dos AVE e dos ARV demonstraram características sensoriais semelhantes, mas existe diferenças entre os perfis destes dois grupos de azeite, comparativamente, aos perfis dos óleos. Alguns dos picos estão enumerados nos cromatogramas e a caracterização sensorial dos compostos, quando possível é apresentada na Tabela 4.2. Esta caracterização é efetuada baseando-se em estudos na literatura [7], [56]. Estes estudos revelam que os compostos associados aos atributos positivos, tais como o 2-hexenal, 2-nonenal, benzaldeído, 1-penten-3-ona, hexano, pentanol, 1-hexanol e o 3-hexen-1-ol, atribuem características frutadas e aroma verde ao azeite, principalmente, aos AVE. O 2-hexenal confere notas frutadas e constitui um dos principais compostos da fração volátil dos azeites de alta qualidade (AVE). O 2-hexenal não está presente no OLFPG e possui um pico pouco intenso no OLFPA.

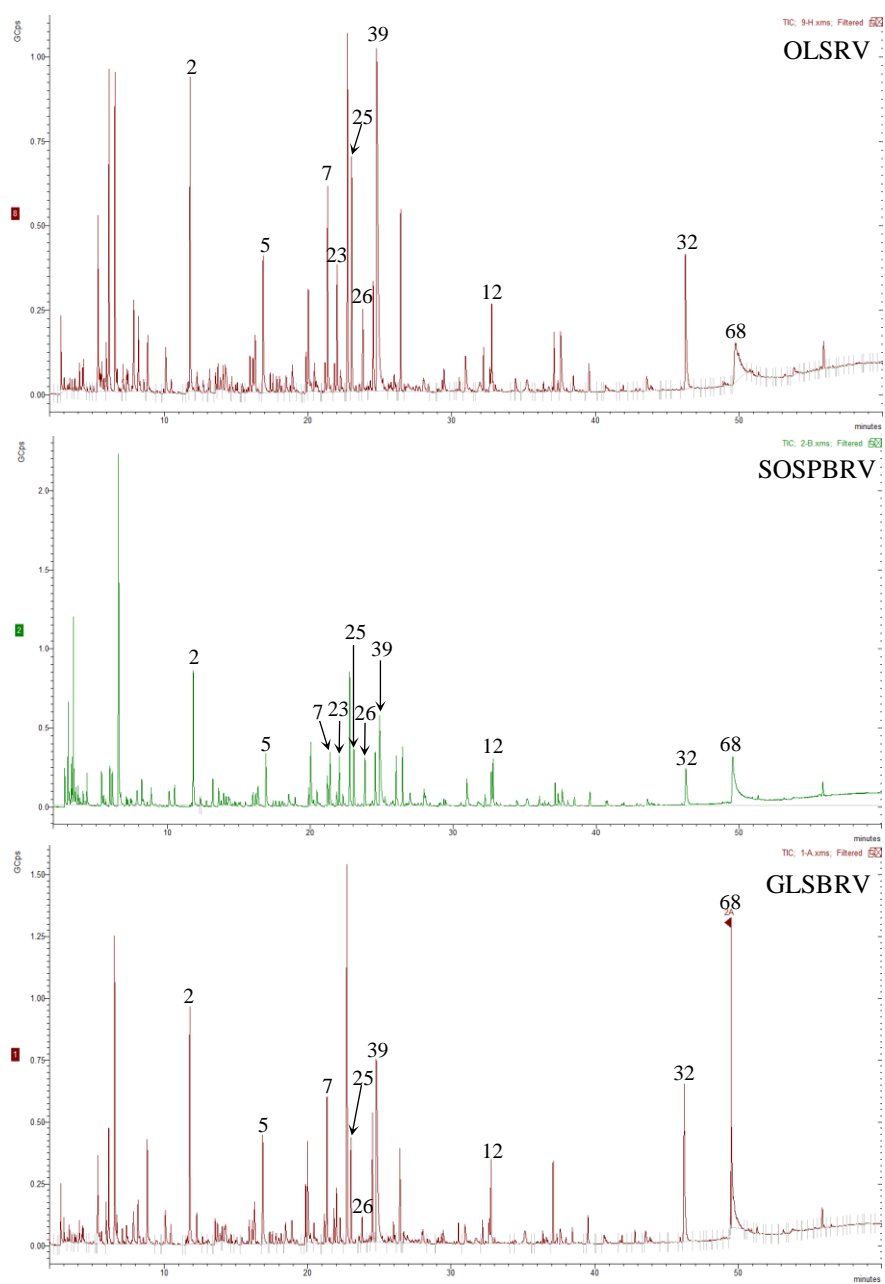
Excetuando o GLSUVÉ, todas as restantes amostras enviadas para a análise dos compostos voláteis apresentaram glicerina na sua composição. Esta componente não era esperada e este resultado indica uma possível contaminação destas amostras devido ao armazenamento das mesmas em frascos de plástico. Esperava-se que as amostras enviadas fossem avaliadas de imediato, e assim foram mantidas em frascos de plástico. No entanto, a presença deste composto não invalida os restantes componentes detetados, pois foram identificados vários compostos esperados no azeite.

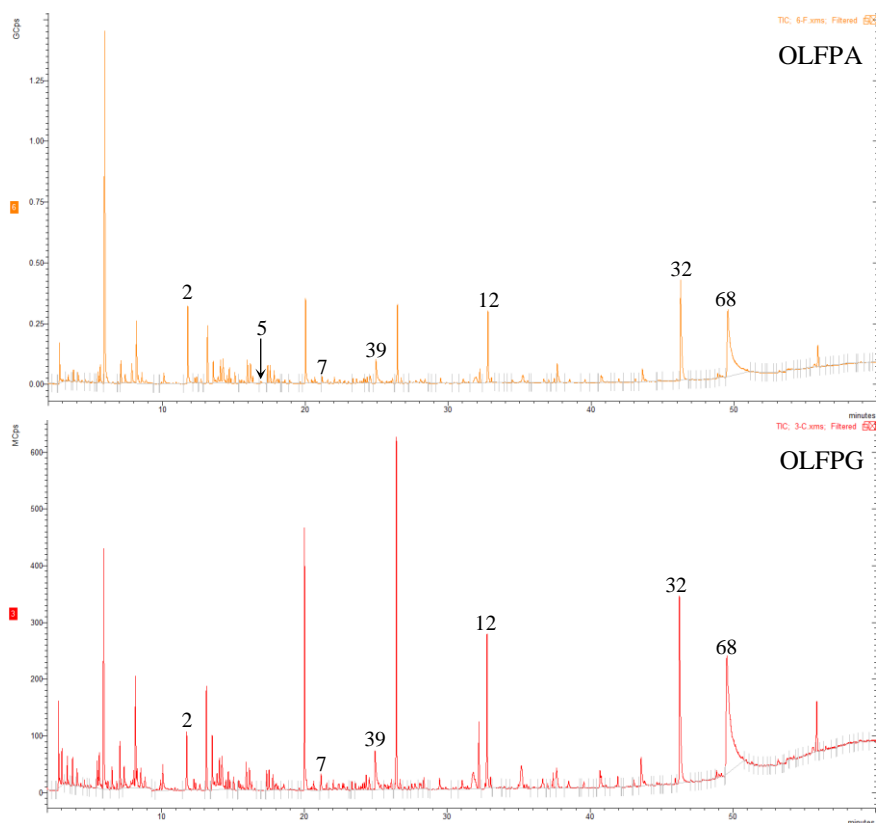


**Figura 4.3:** Cromatogramas obtidos por GC-MS para a determinação dos compostos das amostras: OLSVE, GLSUVE e do GLCLVE.

Como mencionado, alguns compostos são responsáveis por atributos sensoriais negativos, como são os casos de 1-octeno (mofo), acetato de etilo (avinagrado), 2-pentenal (avinagrado), 2-heptenal (mofo, ranço), octanal (ranço), 2-decenal (ranço) e heptanal (ranço). A maior parte destes compostos apresentam picos mais intensos nos ARV do que na categoria AVE, pois estão associados a atributos negativos. De acordo com o estudo [19], a presença de aldeídos é, maioritariamente, produzida por oxidação dos ácidos gordos insaturados, enquanto a presença de ácidos é devido à oxidação dos aldeídos previamente formados. Este estudo revela ainda que a presença

de ácidos pode indicar um elevado grau de alteração das amostras, uma vez que estes compostos aparecem no final do processo oxidativo.





**Figura 4.4:** Cromatogramas obtidos por GC-MS para a determinação dos compostos das amostras: OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPA e OLFPG.

Na Tabela 4.2 estão indicados os tempos de retenção (Tr) dos compostos voláteis identificados e a caracterização sensorial dos mesmos, sendo os compostos detetados e os não detetados assinalados por x e 0, respetivamente.

**Tabela 4.2:** Compostos identificados nas amostras de OLSVE, GLSVE, GLCLVE, OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPA e OLFPG. Os compostos detetados e os não detetados são representados por x e 0, respetivamente.

Grupo químico	Picos	Tr	Composto	Atributo		OLSVE	GLSVE	GLCLVE	OLSRV	SOSPBRV	GLSBRV	OLFPA	OLFPG
				Positivo	Negativo								
Aldeídos	1	7,88	Pentanal	Amêndoa, picante		x	x	x	x	x	x	x	x
	2	11,79	Hexanal		Ranço	x	x	x	x	x	x	x	x
	3	13,07	2-pentenal		Avinagrado	x	x	x	x	x	x	x	x
	4	16,16	Heptanal		Ranço	x	x	x	x	x	x	x	x
	5	16,87	2-hexenal	Erva recém-cortada, banana, amêndoa		x	x	x	x	x	x	x	0

**Tabela 4.2:** Compostos identificados nas amostras de OLSVE, GLSUVE, GLCLVE, OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPa e OLFPg. Os compostos detetados e os não detetados são representados por x e 0, respetivamente. (Continuação)

Grupo químico	Picos	Tr	Composto	Atributo		OLSVE	GLSUVE	GLCLVE	OLSRV	SOSPBRV	GLSBRV	OLFPa	OLFPg
				Positivo	Negativo								
Aldeídos	6	20,44	Octanal		Ranço	x	x	x	x	x	x	x	0
	7	21,17	2-heptenal		Mofo, ranço	x	x	x	x	x	x	x	x
	8	24,52	Nonanal	Folha verde		x	x	x	x	x	x	x	0
	9	26	2,4-heptadienal	Noz		x	x	x	x	x	x	x	0
	10	27,73	Benzaldeído	Amêndoa		x	x	x	x	x	x	x	x
	11	29	2-nonenal	Folha verde		x	x	0	x	x	x	x	0
	12	32,63	2-decenal		Ranço	x	x	x	x	x	x	x	x
	13	36,03	2,4-decadienal	*	*	x	0	0	0	x	x	0	0
Cetonas	14	4,09	Acetona	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	15	8,99	1-penten-3-ona	Picante, folha verde		x	x	x	x	0	0	0	0
	16	21,86	6-metilo-5-hepten-2-ona	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
Álcoois	17	6,14	Propanol	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	18	12,93	2-hexanol	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	19	17,36	3,7-dimetilo-1-octanol	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	20	16,31	Pentanol	Picante		0	x	x	x	x	x	0	0
	21	20,55	2-penten-1-ol	Banana		x	x	0	x	x	x	0	0
	22	21,35	Acetato-3-hexeno-ol	*	*	x	x	x	x	x	x	x	0
	23	22	1-hexanol	Banana, erva recém-cortada		x	x	x	x	x	x	0	0
	24	22,74	1-undecanol	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	25	23,02	3-hexen-1-ol	Folhas verdes, amêndoa amarga		x	x	x	x	x	x	0	0
	26	23,8	2-hexen-1-ol	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	27	29,32	1-octanol		Mofo	x	x	x	x	x	x	0	0

**Tabela 4.2:** Compostos identificados nas amostras de OLSVE, GLSUVE, GLCLVE, OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPA e OLFPG. Os compostos detetados e os não detetados são representados por x e 0, respetivamente. (Continuação)

Grupo químico	Picos	Tr	Composto	Atributo		OLSVE	GLSUVE	GLCLVE	OLSRV	SOSPBRV	GLSBRV	OLFPA	OLFPG
				Positivo	Negativo								
Álcoois	28	37,99	Guaiacol		Madeira, azedo	x	x	x	x	x	x	x	x
	29	38,47	Benzílico	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	30	39,53	Fenetílico	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	31	42,79	Guaiacol de etilo	*	*	0	0	x	x	x	x	0	x
	32	46,22	4-etilfenol	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
Ésteres	33	4,29	Acetato de metilo	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	34	4,38	3-metilhexano ramificado	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	35	5,38	Acetato de etilo		Avina-grado, tulha	x	x	x	x	x	x	0	0
	36	8,83	1-metoxihe-xano	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	37	34,28	1,2-dimetoxi-benzeno	*	*	0	0	0	x	x	x	0	0
	38	35,95	Salicilato de metilo	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
Ácidos	39	24,79	Acético		Azedo, vi-nagre	x	x	x	x	x	x	x	x
	40	30,95	Butanóico		Tulha, queijo	x	x	x	x	x	x	x	x
	41	34,45	Pentanóico		Suor	x	x	x	x	x	x	x	x
	42	37,59	Hexanóico		Ranço, suor	x	x	x	x	x	x	x	x
	43	40,66	Heptanóico		Ranço	x	x	x	x	x	x	x	x
	44	43,53	Octanóico		Oleoso	x	x	x	x	x	x	x	x
	45	46,28	Nonanóico	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
Hidrocarbo-netos	46	3,4	Hidrocarbo-neto não iden-tificado	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	47	6,55	Hexano rami-ficado	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	48	5,96	Diclorome-tano	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	49	6,71	1-octeno		Mofo	x	x	x	x	x	x	0	x

**Tabela 4.2:** Compostos identificados nas amostras de OLSVE, GLSUVE, GLCLVE, OLSRV, SOSPBRV, GLSBRV, OLFPa e OLFPg. Os compostos detetados e os não detetados são representados por x e 0, respetivamente. (Continuação)

Grupo químico	Picos	Tr	Composto	Atributo		OLSVE	GLSUVE	GLCLVE	OLSRV	SOSPBRV	GLSBRV	OLFPa	OLFPg
				Positivo	Negativo								
Hidrocarboretos	50	9,94	Nonano	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	51	10,09	Tolueno	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	52	12,7	3-etilo-1,5-octadieno	Folha verde		x	x	x	x	x	x	0	0
	53	12,28	$\alpha$ -pineno	*	*	0	0	0	x	x	x	0	x
	54	12,71	Dodecano	*	*	0	0	0	0	0	0	x	x
	55	14,23	3,3-dimetilhexano	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	56	14,28	1,2-dimetilbenzeno	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	57	14,52	2,5,6-trimetildecano	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	58	14,68	2,6-dimetilnonano	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	59	14,78	3-etilo-1,5-octadieno	*	*	x	x	x	x	x	x	0	0
	60	15,07	3,7-dimetil-1-octeno	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	61	15,94	Hidrocarboreto não identificado	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	62	16,32	4-metildecano	*	*	0	x	x	0	0	x	0	0
	63	18,15	Limoneno	*	*	x	x	x	x	x	x	x	x
	64	19,85	$\beta$ -ocimeno		Bolorento	x	x	0	x	x	0	x	x
	65	30,5	$\alpha$ -copaeno	*	*	x	x	0	x	x	0	x	x
	66	36,38	Valenceno	*	*	x	x	0	x	x	0	x	x
	67	37,09	$\alpha$ -farneseno		Erva-re-cém cor-tada	x	x	0	x	x	0	x	x
Outro	68	49,52	Glicerina	*	*	x	x	x	x	x	x	0	x

\*) Compostos sem caracterização sensorial.

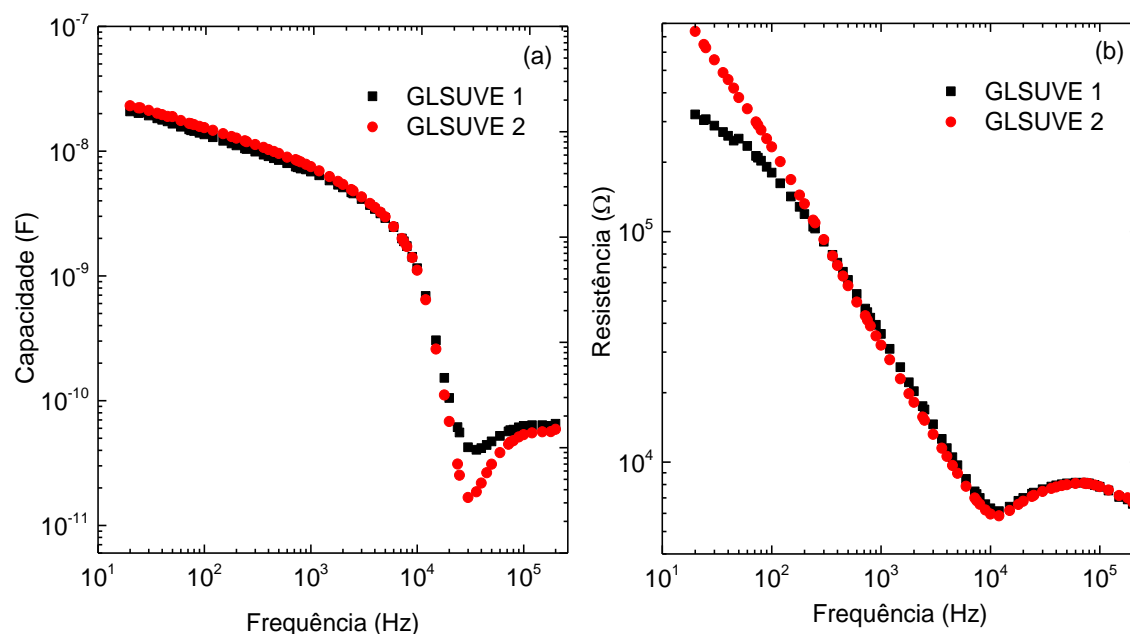


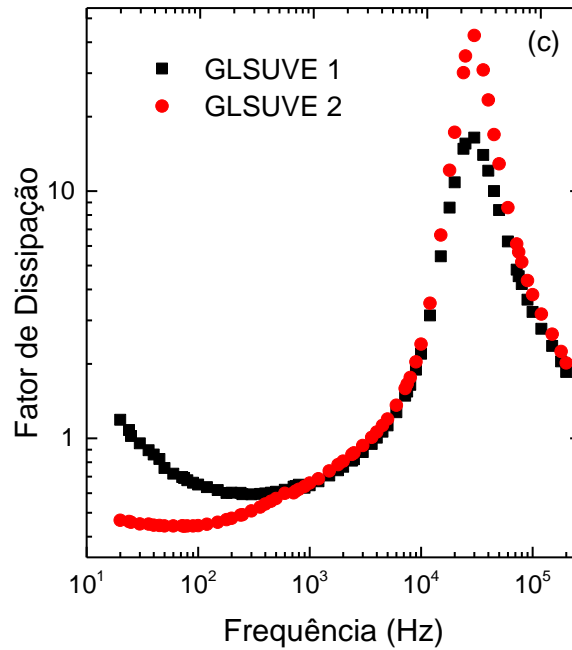
## 4.2 Análise da reprodutibilidade do sensor sem camada sensorial

Após a implementação do sistema de aquisição de dados, a primeira análise efetuada com a técnica principal deste trabalho consistiu em estudar a reprodutibilidade do sensor. A seguir, mediu-se a capacidade e a resistência elétrica e calculou-se o fator de dissipação de duas amostras de azeite de qualidade virgem extra, entre as quais, o GLSUVE e o GLCLVE. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições de temperatura após vários testes realizados a 25 °C e 30 °C. Os melhores resultados foram conseguidos a temperatura de 25 °C, portanto, esta foi a temperatura utilizada nos diferentes ensaios. Para assegurar a funcionalidade do sensor, decidiu-se que este não deveria ser revestido com camada sensorial.

### 4.2.1 Análise em amostras de GLSUVE

A Figura 4.5 representa os espectros de capacidade, de resistência e de fator de dissipação em função da frequência de duas medições de uma amostra de GLSUVE. Percebe-se que os espectros apresentam características capacitivas análogas. Um comportamento semelhante se verifica nos espectros de resistência e de fator de dissipação. No intervalo compreendido entre  $20 \times 10^1$  Hz e  $2 \times 10^4$  Hz o espectro da capacidade demonstra uma boa reprodutibilidade entre as duas medições. A partir de  $2 \times 10^4$  Hz até  $6 \times 10^4$  Hz é visível uma discrepância, mas a tendência inicial é resposta para o intervalo entre  $6 \times 10^4$  Hz e  $2 \times 10^5$  Hz.





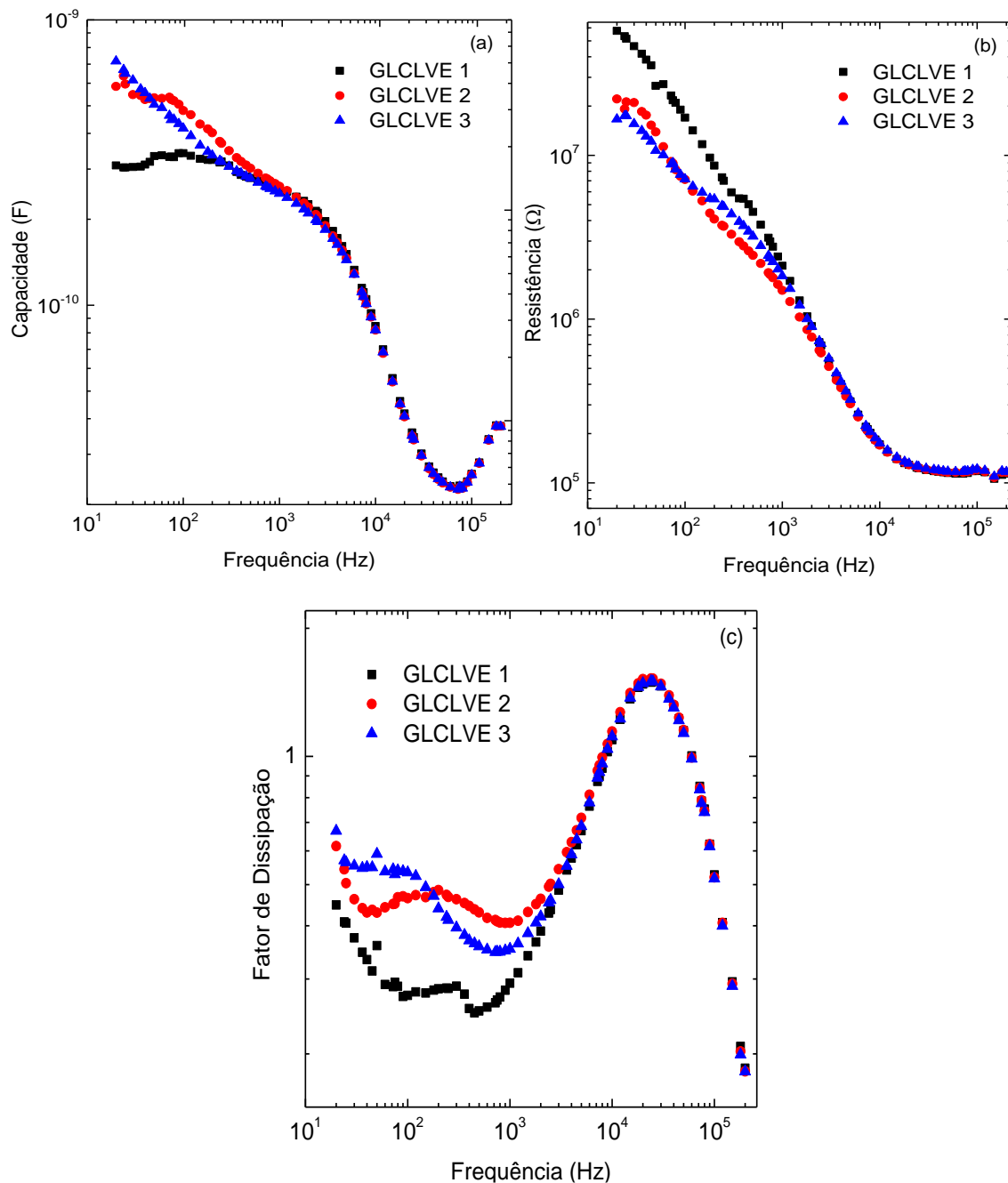
**Figura 4.5:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de duas medições de uma amostra de GLSUVE, obtidos por espectroscopia de impedância nas mesmas condições de temperatura (25 °C).

Os espectros de resistência e de fator de dissipação apresentam zonas instáveis nos intervalos compreendidos entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $1,8 \times 10^2$  Hz e entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $8 \times 10^2$  Hz, respectivamente. Todavia, estes expressam conformidade entre si, pois a partir de  $2,5 \times 10^2$  Hz os espectros de resistência repetem-se. Esta característica reproduz-se no fator de dissipação, mas mostra igualmente um desvio na medição de GLSUVE 2, que neste caso ocorre entre  $1,5 \times 10^4$  Hz e  $7,2 \times 10^4$  Hz.

#### 4.2.2 Análise em amostras de GLCLVE

A reprodutibilidade também foi avaliada em amostras de GLCLVE, da qual resultou os espectros representados na Figura 4.6. Novamente, o comportamento entre as repetições é semelhante, com a capacidade e o fator de dissipação a apresentarem regiões de repetibilidade a partir da vizinhança de  $3 \times 10^3$  Hz e a resistência após  $2 \times 10^3$  Hz. Contudo, é visível uma região de grande instabilidade que corresponde aos valores de frequência entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $1,8 \times 10^3$  Hz para a capacidade, entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $6 \times 10^2$  Hz para a resistência e entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $2,4 \times 10^3$  Hz para o fator de dissipação. Pressupõe-se que estas incoerências e as demonstradas nos ensaios anteriores podem ter sido causadas por algum tipo de agitação mecânica que tenha interferido com os contactos elétricos entre a sonda e o analisador, alguma alteração do teor de humidade das amostras ou pela composição do azeite. Apesar da instabilidade apresentada pela capacidade e resistência elétrica medidos e do fator de dissipação calculado, a informação obtida por este sistema sensorial é útil.

Assim, a fragilidade do sistema não originou grandes preocupações em relação à funcionalidade do sensor interdigitado de ouro. Apesar de não haver consistência absoluta nos resultados de impedância elétrica, considera-se que o sensor é adequado para os diferentes estudos realizados neste trabalho.



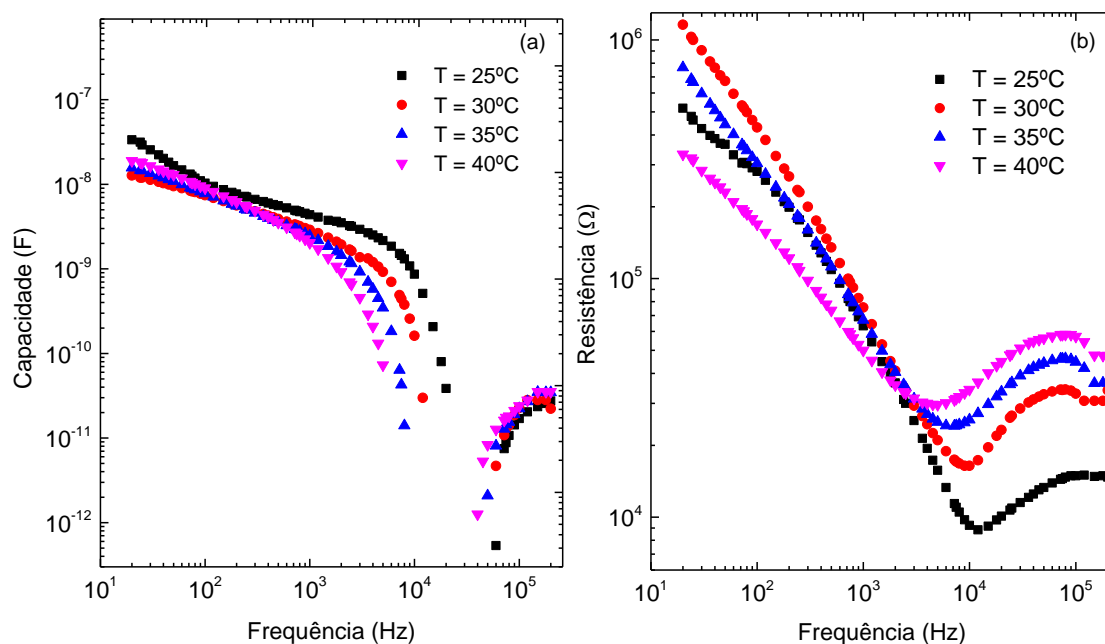
**Figura 4.6:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de duas medições de uma amostra de GLCLVE obtidos por espectroscopia de impedância nas mesmas condições de temperatura (25 °C).

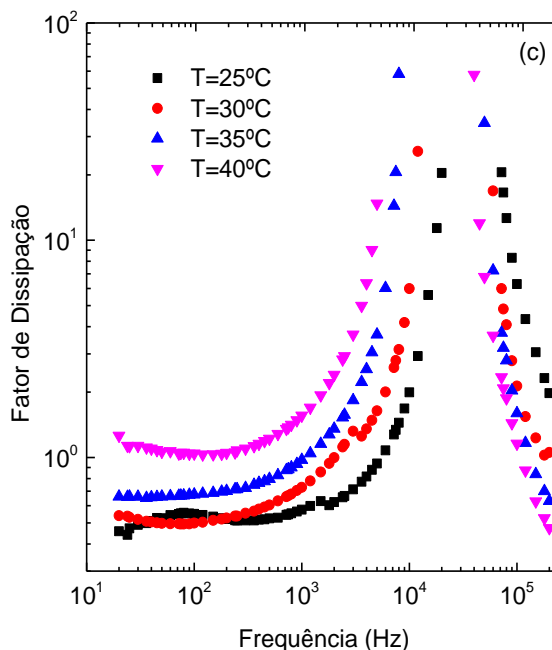
### 4.3 Caracterização de OLSVE exposto a temperatura controlada e luz ambiente

#### 4.3.1 Efeito da temperatura controlada nas medições de impedância

Na Figura 4.7, encontra-se expressa os espectros de capacidade, de resistência e de fator de dissipação em função da frequência para uma amostra de OLSVE submetido a várias temperaturas. Os espectros de capacidade e de resistência não indicam uma tendência definida no intervalo de frequência compreendido entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $6 \times 10^2$  Hz. A partir dos  $6 \times 10^2$  Hz verifica-se uma diminuição dos valores da capacidade elétrica à medida que se aumenta a temperatura.

A resistência apresenta uma boa definição a partir  $3 \times 10^3$  Hz, indicando que quanto maior a temperatura, maior é a resistência do OLSVE, sendo este resultado mais evidente entre  $25^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ . Ao contrário da capacidade e da resistência, o fator de dissipação indica uma tendência de comportamento mais consistente, mostrando que quanto maior a temperatura maior são as perdas de energia eletromagnética. Estes resultados indicam que a temperatura de medição das amostras tem de ser controlada para que as medidas elétricas sejam reproduzíveis.

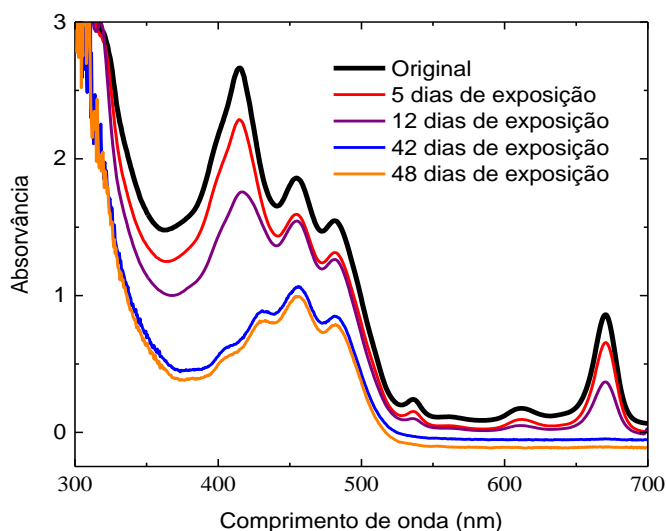




**Figura 4.7:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE, obtidos por espectroscopia de impedância a diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C.

#### 4.3.2 Efeito da luz e temperatura ambiente por UV-Vis

A UV-Vis também permitiu obter os espectros de absorvância de uma amostra de OLSVE, mas, desta vez, pretendeu-se obter informações sobre a sua degradação quando exposta a luz e temperatura ambiente. Como se pode observar na Figura 4.8, houve alterações significativas no espectro do OLSVE após a exposição.

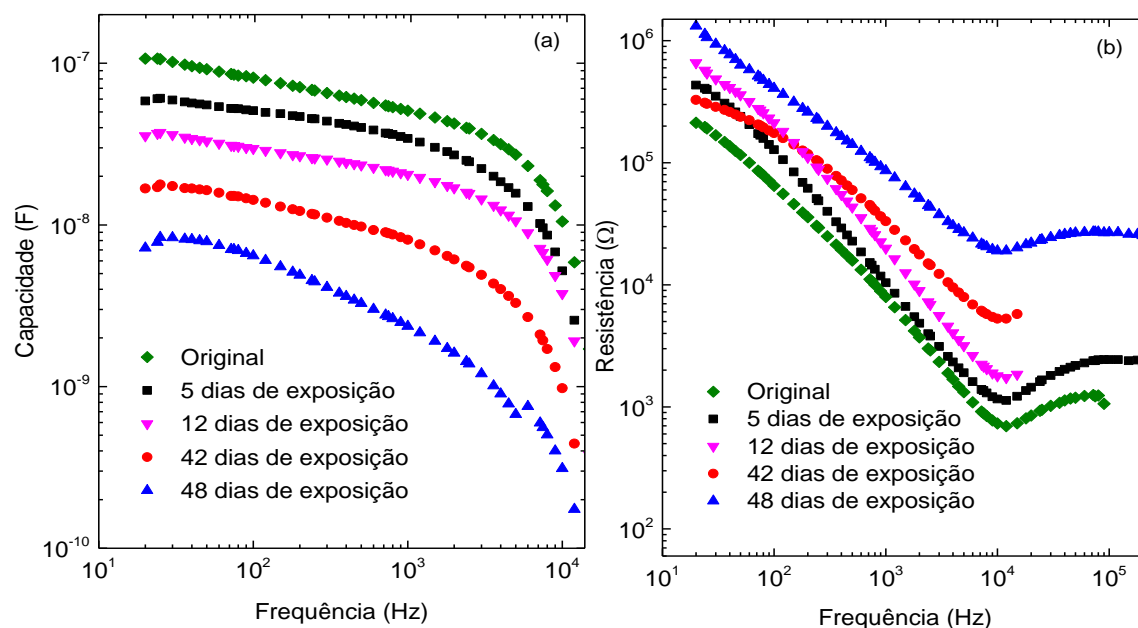


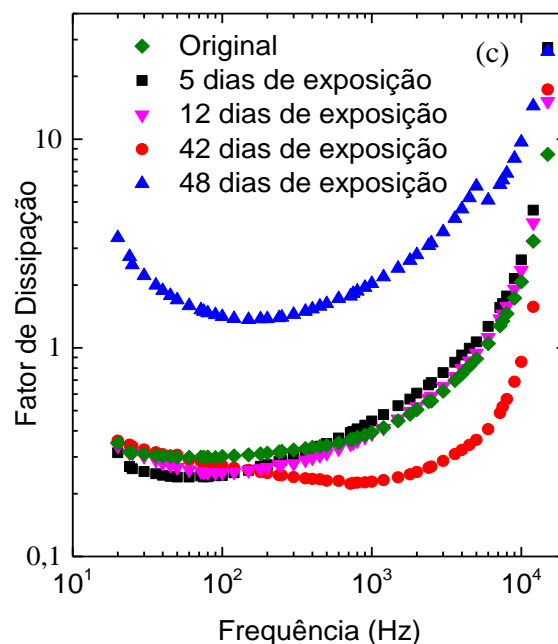
**Figura 4.8:** Espectros de absorção de OLSVE exposto a luz e temperatura ambiente obtidos por UV-Vis na gama dos 300 nm aos 700 nm. A representação gráfica inclui a curva original (amostra de azeite mantida às escuras) e de análises realizadas após 5, 12, 42 e 48 dias da exposição do OLSVE a luz e temperatura ambiente.

Como seria expectável, as bandas de absorção diminuíram com os efeitos da luz, tendo sido verificado uma diminuição significativa da absorção do OLSVE. Após 12 dias, as mudanças são drásticas, tendo havido uma diminuição significativa da absorção nas regiões de carotenoides e de sobreposição de carotenoides com clorofilas. As bandas da região compreendida entre 650 nm e 700 nm desapareceram completamente, pressupondo-se que esta situação deveu-se à fotodegradação do pigmento clorofila ao longo do tempo de exposição.

### 4.3.3 Efeito da luz e temperatura ambiente nas medições de impedância

As amostras monitoradas anteriormente por UV-Vis também foram caracterizadas por espectroscopia de impedância. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.9, e mostram que os efeitos da luz promoveram uma diminuição significativa dos valores da capacidade e originaram um aumento dos valores da resistência. Percebe-se, no entanto, pelo espectro da resistência que a medida realizada após 42 dias se intersesta com as realizadas após 5 dias e 12 dias de exposição à luz nos valores de frequência entre  $5 \times 10^1$  Hz e  $1,8 \times 10^2$  Hz, respetivamente. É evidente uma tendência crescente da resistência após a frequência de  $1,8 \times 10^2$  Hz. O fator de dissipação calculado não demonstrou uma tendência definida, contudo as medidas efetuadas sobre o azeite OLSVE, que permaneceu durante 42 dias exposto à luz e à temperatura ambiente, demonstrou claramente que quanto maior o tempo de exposição maior são as perdas de energia eletromagnética. Para além das causas mencionadas no ensaio em que se estudou a reprodutibilidade do sensor, acredita-se que a instabilidade demonstrada por este parâmetro pode também ter origem nas alterações provocadas pela luz na composição do azeite.





**Figura 4.9:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE exposto durante 5, 12, 42 e 48 dias a luz e temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos por espectroscopia de impedância.

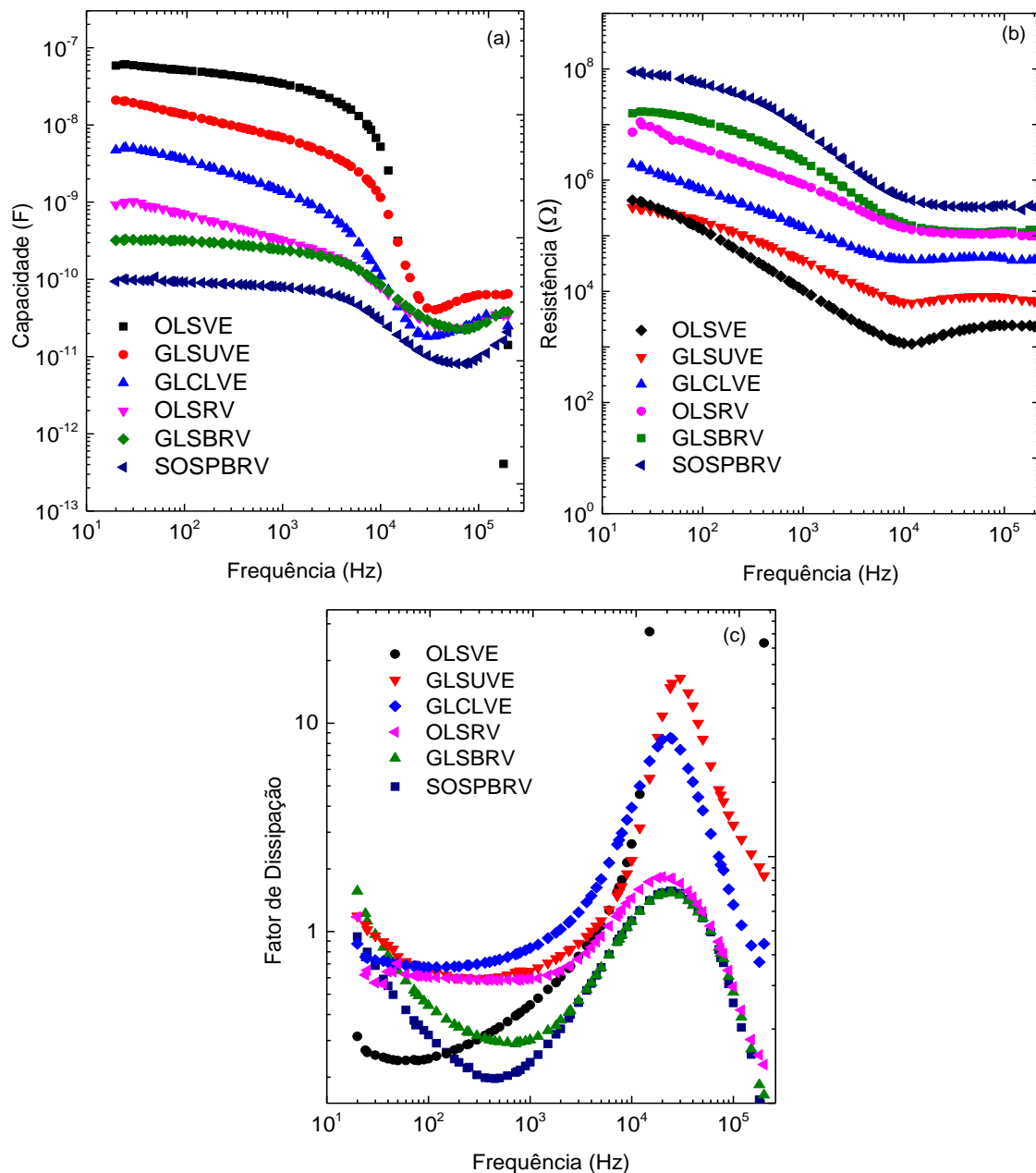
#### 4.4 Classificação de azeites

##### 4.4.1 Análise por espectroscopia de impedância

A impedância elétrica em função da frequência dos vários azeites encontra-se representados na Figura 4.10. Os espectros de capacidade e de resistência demonstram uma separação considerável e este resultado é uma indicação de uma maior diferença de valores de impedância elétrica entre os diferentes azeites. O grupo dos AVE constituído pelo OLSVE, GLSUVE e pelo GLCLVE apresentam valores de capacidade superiores e valores de resistência inferiores. O OLSVE destaca-se, pois é o azeite que melhor apresenta as características referidas. O GLSBRV, OLSRV e o SOSPBRV formam o grupo dos ARV e os seus espectros mostram um efeito inverso na capacidade e na resistência elétrica, isto é, os azeites que contêm azeite refinado e azeite virgem apresentam dados de capacidade inferiores e resistência superiores. Até  $6 \times 10^4$  Hz a resistência é decrescente e a partir deste valor de frequência é praticamente constante para todos os azeites.

Demonstra-se, assim, que a espectroscopia de impedância foi capaz de diferenciar os vários azeites. O comportamento obtido pode ser atribuído à diferente composição dos AVE, uma vez que a sua forma de extração contribui para a preservação dos seus compostos, originando um azeite alta qualidade. Como já foi mencionado, os ARV podem sofrer degradação durante a refi-

nação que promove a destruição de alguns constituintes e, conseqüentemente, perdas de qualidade. O OLSRV e o GLSBRV unem-se a partir dos  $4 \times 10^3$  Hz e esta característica verifica-se quer na capacidade, quer na resistência. Esta característica pode representar alguma semelhança entre estes dois azeites. Mais uma vez, o fator de dissipação calculado a partir da capacidade e da resistência não mostrou uma definição.



**Figura 4.10:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação dos AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE) e dos ARV (OLSRV, GLSBRV e SOSBPBRV), obtidos por espectroscopia de impedância.



#### 4.4.2 Extração de variáveis para análise em PCA

Com a exceção do fator de dissipação, os espectros de capacidade e de resistência obtidos na análise anterior demonstraram consistência na distinção dos seis azeites. Contudo, extrair conclusões dos espectros separadamente não é suficiente, sendo fundamental encontrar outras variáveis através da técnica de estatística multivariada PCA que consigam distinguir os diferentes tipos de azeite. Dada a importância das variáveis selecionadas na interpretação do resultado final, o primeiro passo para a aplicação desta técnica consistiu na extração das mesmas.

Percebeu-se que o comportamento dos espectros de capacidade e de resistência poderiam ser descritos por funções lineares em determinados intervalos. Esta característica foi confirmada após a aplicação do modelo de regressão linear ( $y = a + bx$ ) a cada um dos espectros. Em particular para o espectro de capacidade,  $y$  representa a capacidade,  $x$  a frequência e os parâmetros ( $a$ ) e ( $b$ ) caracterizam o espectro. Para obter um ajuste linear que defina melhor os valores dos espectros de capacidade e de resistência, aplicou-se o modelo de regressão linear nos intervalos de frequência entre  $1,77 \leq \log f \leq 2$  e entre  $2,85 \leq \log f \leq 3,07$  a cada um dos espectros. Pretendeu-se que os intervalos de impedância selecionados revelassem uma melhor relação com os diferentes tipos de azeite. A impedância elétrica no valor de frequência fixa  $2 \times 10^3$  Hz foi considerada também uma variável e foi escolhida devido às semelhanças de comportamento entre os valores de capacidade, resistência e o rácio de azeite. Os valores do fator de dissipação calculado a partir da capacidade e da resistência são muito incoerentes e, portanto não foram considerados na PCA. Alguns compostos com caracterização positiva ou negativa que permitem discriminar as categorias de azeite (AVE e ARV) e os óleos (OLFPA e OLFPG) foram, igualmente, selecionados para a PCA. A Tabela 4.3 contém o conjunto de variáveis extraídas a partir dos espectros de impedância, dos resultados adquiridos por UV-Vis e pelos compostos obtidos por GC-MS.

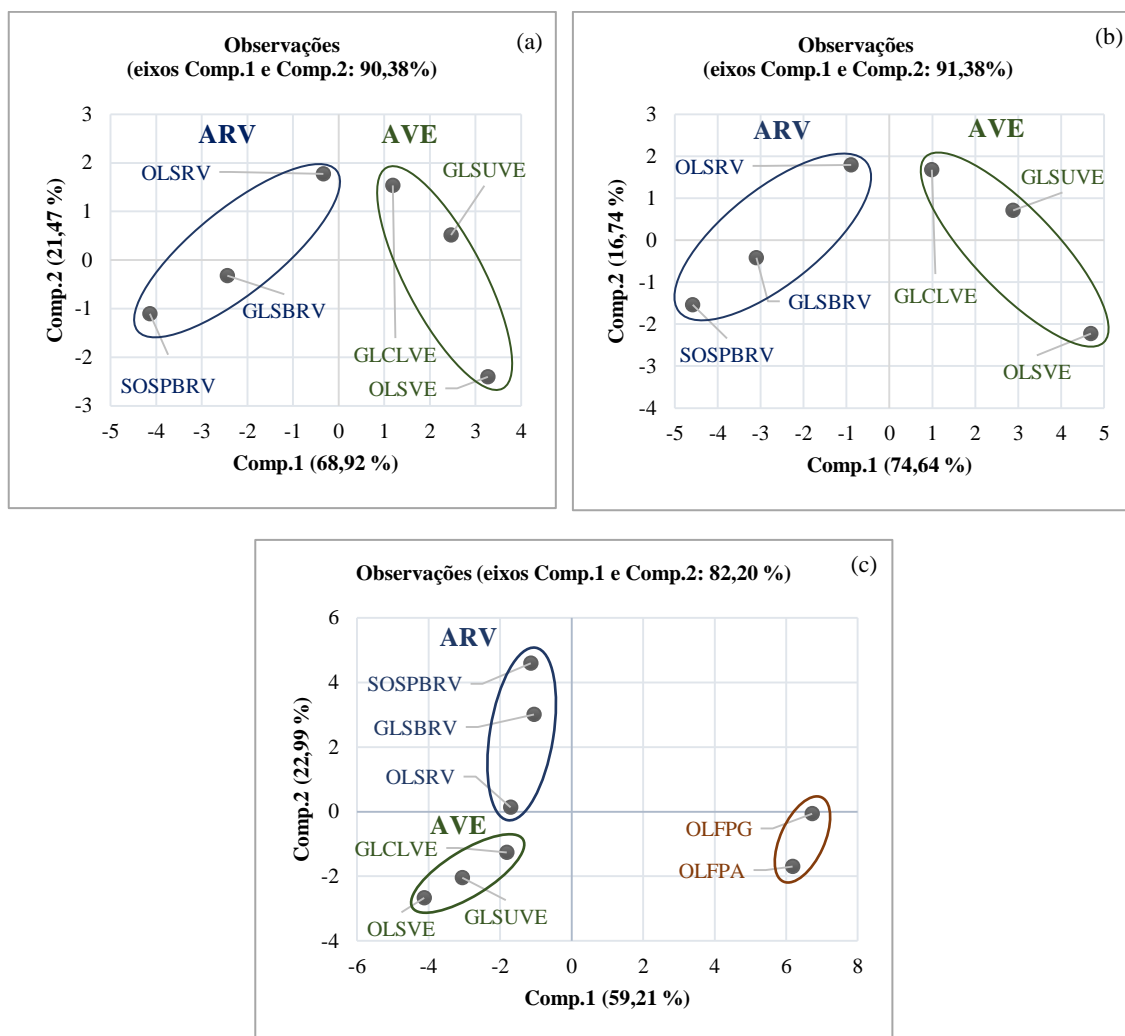
**Tabela 4.3:** Variáveis selecionadas a partir dos espectros de impedância, de UV-Vis e de GC-MS para o método estatístico PCA.

Intervalos	Espectros	Variáveis	Outras variáveis
<b><math>1,77 \leq \log \text{ frequência} \leq 2</math></b>	Log (capacidade)	$a, b$	Capacidade ( $2 \times 10^3$ Hz)
	Log (resistência)	$a, b$	Resistência ( $2 \times 10^3$ Hz)
			Intensidade das principais
<b><math>2,85 \leq \log \text{ frequência} \leq 3,07</math></b>			bandas do espectro de absorção dos azeites.
	Log (capacidade)	$a, b$	Compostos dos azeites e dos óleos obtidos por GC-MS.
	Log (resistência)	$a, b$	

#### 4.4.3 Análise pelo método PCA

Após a seleção das variáveis, aplicou-se o método PCA, da qual resultou uma representação gráfica bidimensional com a componente principal 1 (Comp.1) versus a componente principal 2 (Comp.2). Inicialmente, aplicou-se o método PCA às variáveis extraídas na análise de impedância descritas anteriormente, cuja representação gráfica encontra-se na Figura 4.11 (a). Este resultado demonstra que a Comp.1 explica 68,92% da variância total dos dados que revela uma relação entre esta componente e os diferentes azeites. Posteriormente, foram adicionados ao resultado anterior as intensidades das principais bandas de absorção obtidos por UV-Vis, tendo obtido o resultado mostrado na Figura 4.11 (b), onde a Comp.1 passou a explicar 74,64% da variabilidade total dos dados. Tendo em conta que as observações definem o número de linhas na matriz de dados e que as variáveis correspondem ao número de colunas, para este conjunto de dados obteve-se uma matriz de dados de 6 linhas por 14 colunas (6×14). Através destes dois resultados verifica-se que a PCA agrupou as duas categorias de azeite (AVE e ARV), em que os AVE apresentam valores positivos na Comp.1, enquanto os ARV possuem valores negativos nesta componente. Ainda assim, o gráfico mostra uma dispersão considerável entre os AVE e entre os ARV, provavelmente, devido às diferenças em seus perfis de capacidade e resistência, inerentes à composição das duas categorias de azeite. O OLSVE encontra-se separado dos restantes AVE no quarto quadrante e possui valores superiores na Comp.1. O OLSRV isola-se no segundo quadrante, enquanto os outros dois ARV encontram-se no terceiro quadrante. Do ponto de vista da variância, a Comp.2 apresenta apenas 16,74% que é considerado um resultado pouco expressivo, assim, esta componente mostra-se pouco relevante para a explicação dos dados.

A representação gráfica da Figura 4.11 (c) representa a aplicação do método PCA com a adição dos dados das amostras dos dois tipos óleo e alguns compostos obtidos por GC-MS. Nesta análise foram selecionados 14 compostos na Tabela 4.2, sendo 7 com características positivas (1-penten-3-ona, 2-penten-1-ol, 2-hexenal, pentanol, 3-hexen-1-ol, pentanal e 1-hexanol) e 7 com características negativas (2-pentenal, 1-octanol, guaiacol, acetato de etilo, ácido acético, ácido butanoico e 1-octeno). O resultado mostra que a PCA separou com eficácia os AVE no terceiro quadrante, os ARV no segundo quadrante e os óleos concentram-se no quarto quadrante. A Comp.1 apresenta uma variabilidade dos dados de 59,21% e os azeites (AVE e ARV) apresentam valores negativos, enquanto os óleos (OLFPA e OLFPG) mostram valores positivos nesta componente.



**Figura 4.11:** Representações gráficas que mostram a relação entre as amostras: AVE (OLSVE, GLSUVE e GLCLVE), ARV (OLSRV, GLSBRV e SOSPBVR) e os óleos (OLFPA e OLFPB) e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam (a) 90,38% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente apenas à análise de impedância (b) 91,38% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente à adição das intensidades das bandas de absorção e (c) 82,20% da variabilidade total dos dados, sendo este resultado referente à adição das amostras de óleo e dos compostos com características positivas ou negativas.

#### 4.5 Discriminação de AVE adulterado com óleos alimentares

Para avaliar a impedância de azeite adulterado, foram produzidas misturas de OLSVE com o OLFPB e o OLFPB. Nesta análise pretendeu-se verificar se as medições de impedância fornecidas pelo analisador indicavam a presença dos dois óleos considerados de menor qualidade. Esta sequência de ensaios consiste, primeiramente, numa análise com um sensor interdigitado que após cada ensaio foi lavado para ser reutilizado, mantendo a sua integridade. Inicialmente, mediu-se a capacidade e a resistência à temperatura de 25 °C e, posteriormente, calculou-se o fator de dissipação de OLSVE adulterado com as diferentes quantidades de dois tipos de óleo conforme os

níveis descritos na Tabela 3.4.

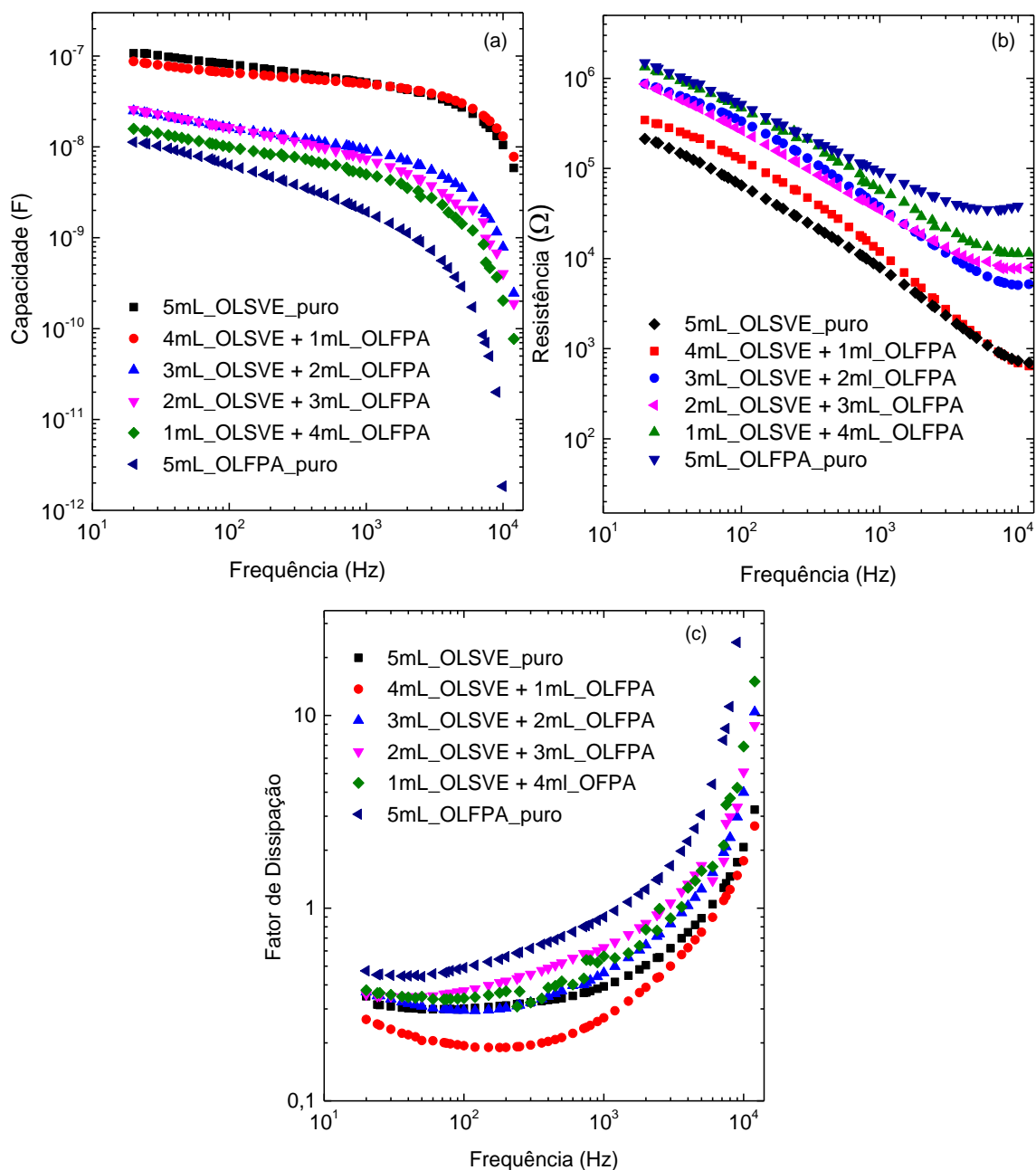
Para discriminar as misturas de OLSVE comOLFPA, foram produzidos filmes finos compostos por cinco bicamadas de (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e de (PAH/GO)<sub>5</sub>, cuja finalidade foi melhorar a sensibilidade do sistema composto pelo substrato de vidro e pelos elétrodos interdigitados de ouro em relação à mistura de OLSVE comOLFPA. Assim, pretende-se que os filmes finos atribuam comportamentos elétricos diferentes aos elétrodos interdigitados. A análise de impedância das misturas utilizando este novo sistema ocorreu conforme a um método idêntico àquele que foi usado nos ensaios sem filme. Para avaliar a versatilidade dos elétrodos na detecção de anomalias no OLSVE, também, foram produzidas misturas de OLSVE comOLFPG que, igualmente, foram realizadas sob às mesmas condições já mencionadas.

#### **4.5.1 Análise de OLSVE adulterado comOLFPA**

##### **4.5.1.1 Análise com o sensor sem camada sensorial**

A Figura 4.12 mostra os espectros de capacidade, de resistência e de fator de dissipação em função da frequência de OLSVE adulterado comOLFPA. Como se pode observar através deste resultado, a presença do óleo em OLSVE originou uma redução dos valores de capacidade, ao mesmo tempo que se verificou uma definição crescente dos valores de resistência. Neste sentido, admite-se que o sistema referente ao ensaio composto pela amostra 5mL\_OLSVE\_puro possua maior capacidade de armazenamento de energia do que as restantes amostras analisadas. Na gama de frequência entre  $2 \times 10^1$  Hz e  $3 \times 10^3$  Hz, os espectros de capacidade do 5mL\_OLSVE\_puro e do OLSVE adulterado indicaram uma dependência menor com a frequência, ao contrário do 5mL\_OLFPA\_puro que decai para valores de frequência mais baixos. De uma forma geral, os valores mostraram uma menor variação da capacidade para baixas frequências, portanto, admite-se que para esta região o equilíbrio entre a orientação das moléculas das amostras e o campo elétrico seja melhor.

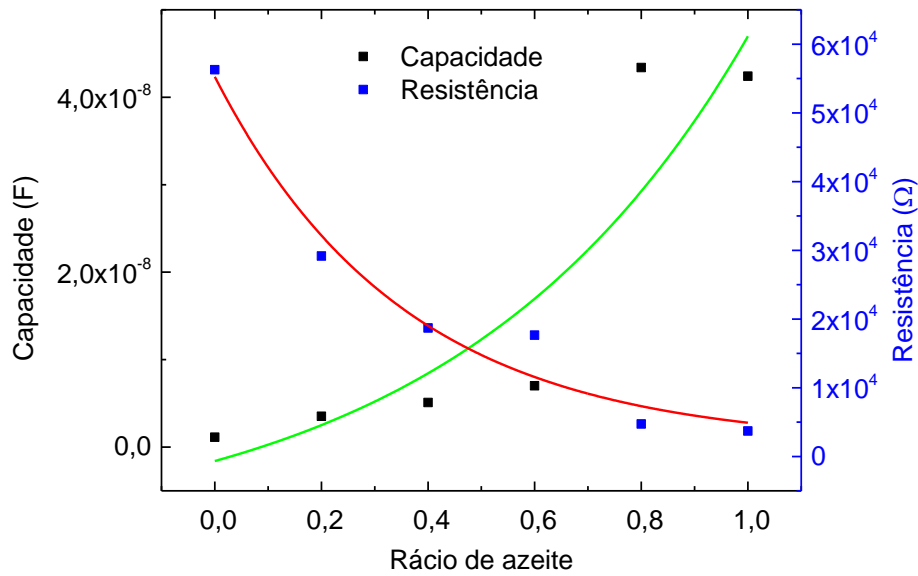
Como se pode observar na Figura 4.12 (c), o fator de dissipação não apresentou uma tendência evidente à medida que se aumentou a quantidade de óleo no azeite, sendo superior para o 5mL\_OLFPA\_puro. Esta característica é mais evidente para valores de frequência compreendido entre  $3 \times 10^3$  Hz e  $1 \times 10^4$  Hz. Todos os espectros mostraram algumas regiões irregulares, como por exemplo, a capacidade de 5mL\_OLSVE\_puro sobrepôs-se com o 4mL\_OLSVE + 1mL\_OLFPA entre  $1,2 \times 10^3$  Hz e  $2,5 \times 10^3$  Hz. Os espectros de resistência e de fator de dissipação também apresentam regiões onde os pontos espectrais das diferentes amostras se intersejam.



**Figura 4.12:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de azeite OLSVE adulterado com o sensor sem camada sensorial, obtidos por espectroscopia de impedância.

Os espectros de capacidade e de resistência demonstram que, na vizinhança dos  $2 \times 10^3$  Hz, apresentam um comportamento elétrico semelhante entre os diferentes rácios de azeite. Assim, efetuou-se um estudo pormenorizado à impedância neste valor de frequência. A diferença de valores de capacidade, de resistência e de fator de dissipação entre o rácio de azeite analisado foi outro critério considerado. Isto quer dizer que, quanto maior a separação entre os espectros adquiridos maior será a diferença de impedância entre as diferentes quantidades de mistura. Este critério se

verifica à frequência de  $2 \times 10^3$  Hz para os espectros de capacidade, de resistência e de fator de dissipação das amostras. O estudo demonstrou que a capacidade aumenta exponencialmente com o rácio de azeite, podendo ser descrita pela função do tipo  $(y = A_1 \exp(\frac{-x}{t_1}) + y_0)$ , onde  $y$  representa a capacidade e  $x$  o rácio de azeite. Relativamente à resistência, apesar de ser descrito igualmente por uma função exponencial do mesmo tipo, verifica-se o oposto, ou seja, diminui exponencialmente à medida que a quantidade de OLFPA se reduz na mistura, como se pode comprovar pela Figura 4.13. A função que melhor descreve os dados experimentais é a exponencial da resistência com  $R^2 = 0,95$ .



**Figura 4.13:** Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com o OLFPA para a frequência fixa de  $2 \times 10^3$  Hz. O sensor não se encontrava revestido com filmes finos. As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente,

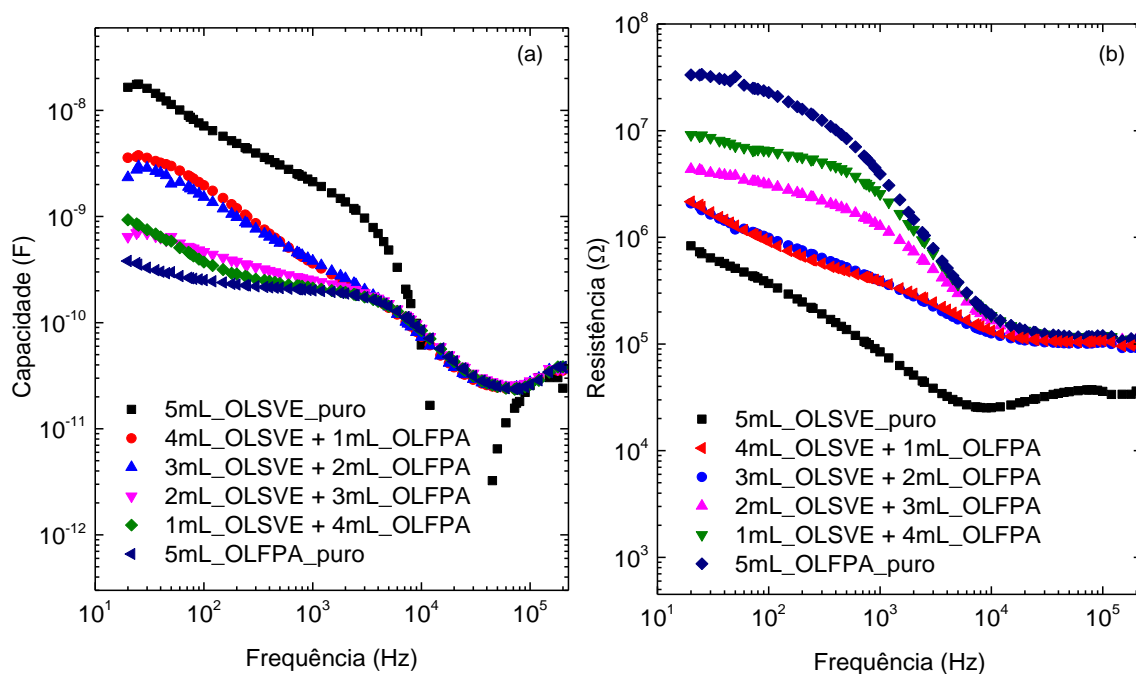
**Tabela 4.4:** Parâmetros dos ajustes com curvas exponenciais da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPA com o sensor sem camada sensorial.

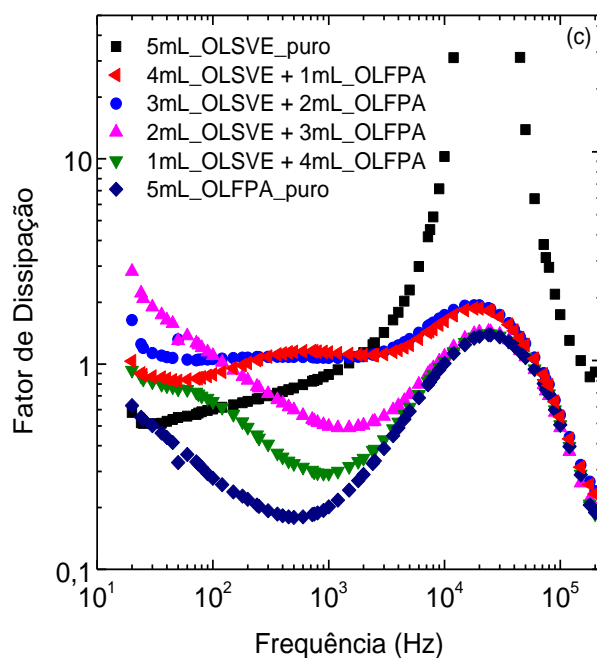
Espetros	Função	Parâmetros	Valores dos parâmetros	$R^2$
Capacidade	$y = A_1 \exp(\frac{-x}{t_1}) + y_0$	$y_0$	$-1,1 \times 10^{-8} \pm 2,9 \times 10^{-8}$	0,72
		$A_1$	$9,3 \times 10^{-9} \pm 2,3 \times 10^{-8}$	
		$t_1$	$0,5 \pm 0,6$	
Resistência	$y = A_1 \exp(\frac{-x}{t_1}) + y_0$	$y_0$	$1,7 \times 10^3 \pm 5,9 \times 10^3$	0,95
		$A_1$	$5,4 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^3$	
		$t_1$	$0,4 \pm 0,1$	

#### 4.5.1.2 Análise com o sensor com camada sensorial (PAH/PAZO)<sub>5</sub>

Pelo mesmo procedimento utilizado no ensaio das misturas com o sensor sem filme, foram também analisadas misturas com as combinações de bicamadas de (PAH/PAZO)<sub>5</sub>. A análise anterior com o uso de um sensor interdigitado sem filme em misturas de OLSVE com OLFPA demonstrou que a LE por espectroscopia de impedância é viável e tem potencial, pois os resultados iniciais indicaram que o sensor acusou a presença do óleo no azeite. Assim, este ensaio consistiu na análise espectral de um sistema sólido-líquido distinto, em que o sensor se encontrava revestido por bicamadas de (PAH/PAZO)<sub>5</sub>. Para além de melhorar a sensibilidade do sensor, pretende-se que os compostos adsorvidos atribuem comportamentos elétricos distintos ao sensor.

Os resultados expressos na Figura 4.14 demonstraram que houve alterações nas características do sistema, provavelmente, originadas pela adsorção dos polieletrólitos no sensor interdigitado. Novamente, verifica-se que a capacidade diminui à medida que se adiciona o OLFPA no OLSVE. Os valores indicam uma diferença considerável de impedância entre as amostras de 5mL\_OLSVE\_puro e 4mL\_OLSVE + 1mL\_OLFPA. O espectro da amostra 5mL\_OLSVE\_puro interseja com as restantes na vizinhança dos  $8 \times 10^3$  Hz. No entanto, para as misturas e para o 5mL\_OLFPA\_puro este comportamento verifica-se para valores de frequência mais baixos, cerca de  $2,5 \times 10^3$  Hz.





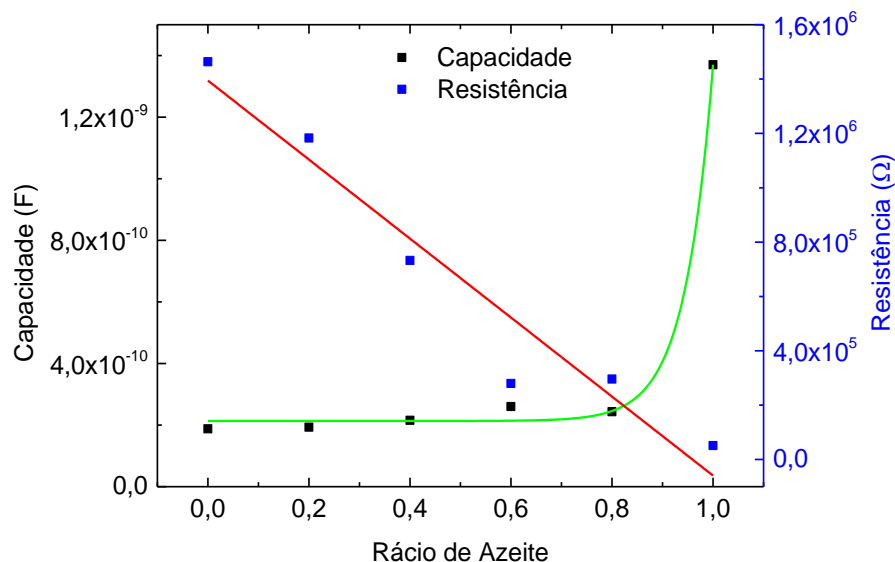
**Figura 4.14:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE adulterado com OLFPFA com o sensor revestido com camadas sensoriais de (PAH/PAZO)<sub>5</sub>, obtidos por espectroscopia de impedância.

A resistência apresenta-se crescente com o aumento da quantidade de OLFPFA nas misturas, com a particular realce de os valores serem maiores para 5mL\_OLFPFA\_puro. A partir de  $1,8 \times 10^4$  Hz todos os ensaios que contêm OLFPFA mostram diferenças de resistências mínimas, exceto o 5mL\_OLSVE\_puro que se encontra distante dos restantes espectros. O comportamento do fator de dissipação calculado repete-se com valores pouco coerentes e as possíveis causas foram explicadas na análise da reprodutibilidade do sensor.

Sabendo que a interface sólido-líquido se alterou devido à adsorção dos filmes que modificou as suas características, torna-se importante compreender como se comporta o novo sistema. Os espectros anteriores indicaram que, para a frequência fixa de  $2 \times 10^3$  Hz, a capacidade e a resistência também apresentaram um comportamento semelhante e uma boa diferença de impedância entre o azeite puro e o 4mL\_OLSVE + 1mL\_OLFPFA. Deste modo, o estudo detalhado representado no gráfico da Figura 4.15 mostra que a capacidade pode ser descrita por uma função exponencial que apresenta um valor máximo para o 5mL\_OLSVE\_puro (rácio de azeite 1) e decresce, consideravelmente, até a mistura de 4mL\_OLSVE + 1mL\_OLFPFA (rácio de azeite 0,8) e mais moderado a partir desta quantidade para as restantes amostras. A resistência diminuiu linearmente à medida que a quantidade de OLFPFA reduziu na mistura. Os valores são menores para a amostra de 5mL\_OLSVE\_puro (rácio de azeite 1). Este sistema apresenta melhor semelhança de compor-



tamento entre as amostras, pois os ajustes de capacidade e de resistência explicam os dados experimentais com  $R^2 = 0,99$  e  $R^2 = 0,93$ , respetivamente, como se pode constatar na Tabela 4.5. Este facto pode ser explicado pela adsorção das combinações dos polieletrólitos PAH e do PAZO que, provavelmente, melhoraram a sensibilidade do sensor interdigitado na distinção das misturas.



**Figura 4.15:** Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPA para a frequência fixa de  $2 \times 10^3$  Hz. O sensor se encontrava revestido com as combinações dos polieletrólitos (PAH/PAZO)<sub>5</sub>. As linhas a verde e a vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais e lineares da curva de capacidade e de resistência, respetivamente.

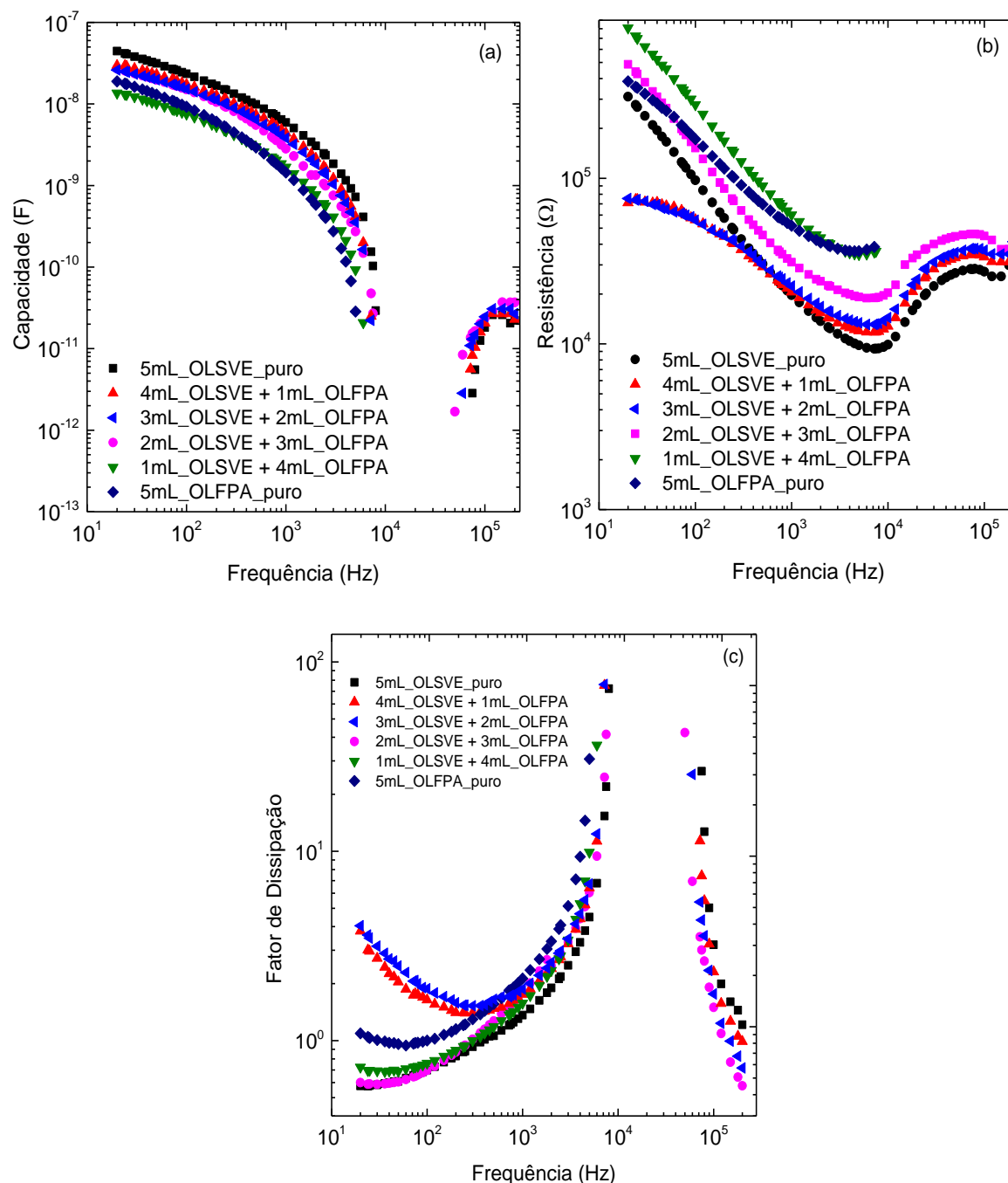
**Tabela 4.5:** Parâmetros dos ajustes exponencial e linear da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPA com o sensor revestido com (PAH/PAZO)<sub>5</sub>.

Espetros	Função	Parâmetros	Valores dos parâmetros	$R^2$
Capacidade	$y = A_1 \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + y_0$	$y_0$	$2.1 \times 10^{-10} \pm 1.7 \times 10^{-11}$	0.99
		$A_1$	$1.9 \times 10^{-17} \pm 1.1 \times 10^{-16}$	
		$t_1$	$-0.1 \pm 0.02$	
Resistência	$y = a + bx$	$a$	$-1.5 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^5$	0.93
		$b$	$1.4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$	

#### 4.5.1.3 Análise com o sensor com camada sensorial (PAH/GO)<sub>5</sub>.

Nas mesmas condições que o sistema sem filme e de (PAH/PAZO)<sub>5</sub> utilizou-se também os filmes finos de (PAH/GO)<sub>5</sub> na análise de OLSVE adulterado com OLFPA. Conforme se pode

observar pelos espectros da Figura 4.16, esta nova combinação de polieletrólitos alterou as propriedades elétricas do sistema sólido-líquido.

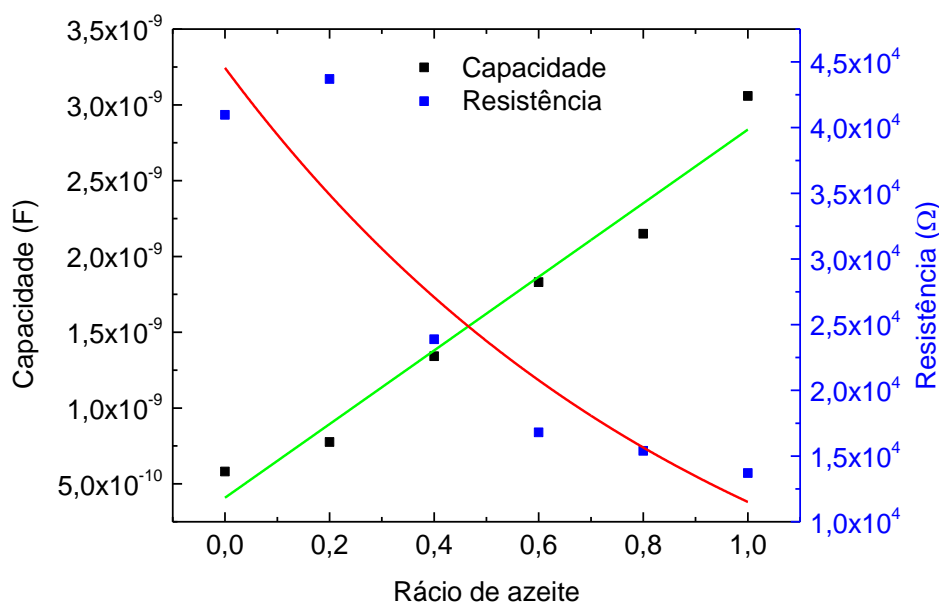


**Figura 4.16:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação de OLSVE adulterado com OLFPA com o sensor revestido com camadas sensoriais (PAH/GO)<sub>5</sub>, obtidos por espectroscopia de impedância.

A degradação das propriedades capacitivas do azeite quando se adicionou o óleo predominou, enquanto o comportamento da resistência também repetiu-se, isto é, quanto maior a quantidade

de óleo na mistura, maior é a sua resistência. Percebe-se, porém, que os resultados do parâmetro resistência não são totalmente coerentes, pois seria de esperar uma evolução progressiva em função da frequência. Esta característica é mais evidente para baixas frequências relativamente às amostras, mas altera a partir de  $3 \times 10^3$  Hz quando começa a haver uma definição. O fator de dissipação também é muito irregular para baixas frequências, mas demonstra que o seu valor é maior para o 5mL\_OLFPA\_puro. Percebe-se através deste sistema que a diferença de impedância entre as quantidades diminuíram, mas ainda assim, este sistema apresenta uma sensibilidade razoável na discriminação entre as quantidades de misturas.

Novamente, interessa verificar se para a frequência de  $2 \times 10^3$  Hz os valores de capacidade e de resistência do rácio de azeite apresentam uma boa separação. Neste sistema, a capacidade apresenta um bom ajuste dos pontos experimentais com  $R^2 = 0,96$  e aumenta linearmente à medida que a quantidade de OLSVE decrece nas misturas. O valor de capacidade é maior para a amostra 5mL\_OLSVE\_puro (rácio de azeite 1). Este resultado é perceptível no gráfico representado na Figura 4.17. A resistência pode ser descrita por uma função exponencial que não explica com eficácia os valores experimentais, como se pode observar pelo valor do coeficiente de determinação expresso na Tabela 4.6.



**Figura 4.17:** Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPA para a frequência fixa de  $2 \times 10^3$  Hz. O sensor se encontrava revestido com as combinações dos polieletrólitos (PAH/GO)<sub>5</sub>. As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções lineares e exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente.

**Tabela 4.6:** Parâmetros dos ajustes linear e exponencial da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFPa com o sensor revestido com (PAH/GO)<sub>5</sub>.

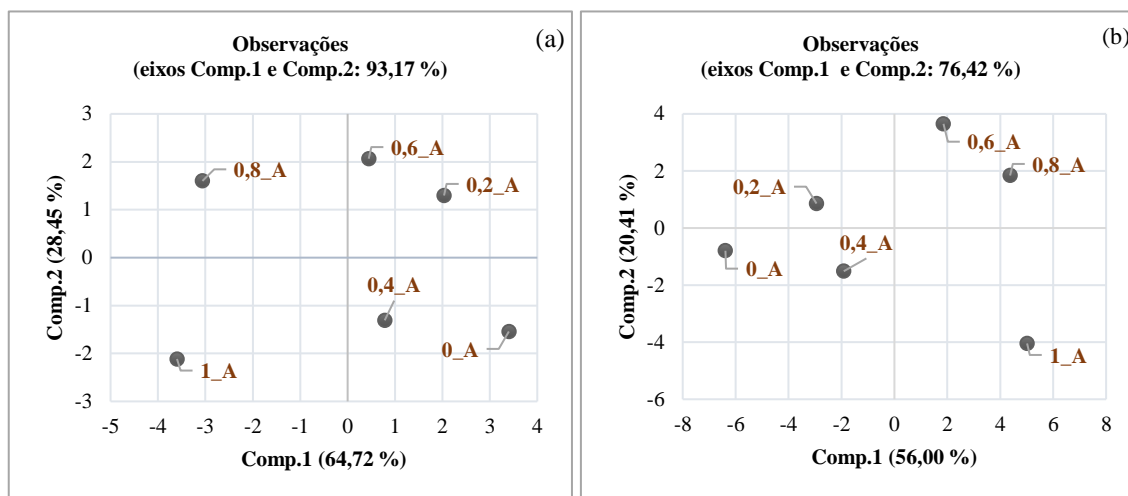
Espetros	Função	Parâmetros	Valores dos parâmetros	R <sup>2</sup>
Capacidade	$y = a + bx$	$a$	$2,4 \times 10^{-9} \pm 2,2 \times 10^{-10}$	0,96
		$b$	$4,1 \times 10^{-10} \pm 1,3 \times 10^{-10}$	
Resistência	$y = A_1 \exp\left(\frac{-x}{t_1}\right) + y_0$	$y_0$	$-6 \times 10^3 \pm 4,8 \times 10^4$	0,77
		$A_1$	$5 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^4$	
		$t_1$	$0,95 \pm 1,5$	

#### 4.5.1.4 Análise pelo método PCA

Para esta análise foram considerados três sistemas distintos: um sistema composto pelo sensor sem a adsorção de filmes e outros dois sistemas com os sensores revestidos com (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e (PAH/GO)<sub>5</sub>, respetivamente. Igualmente, foram escolhidos neste conjunto de dados as variáveis cujos valores de impedância expressam melhor uma relação com o rácio de azeite. A seleção de variáveis ocorreu nos mesmos moldes que a extração apresentada na Tabela 4.3, com a exceção da intensidade das bandas de absorção e dos compostos obtidos por GC-MS. De forma a haver coerência, as variáveis foram selecionadas nos mesmos intervalos ( $1,77 \leq \log f \leq 2$  e  $2,85 \leq \log f \leq 3,07$ ), independentemente do ensaio.

Através dos resultados expressos na Figura 4.18 (a), obtidos pela aplicação da PCA somente às variáveis nos intervalos referidos, mas no ensaio sem filme, verifica-se que as amostras 1\_A e 0,8\_A estão próximas, mas com uma separação aceitável no sentido crescente na Comp.1 que representa uma variabilidade de 64,72%. Todas as restantes observações com quantidades maiores de óleo possuem valores positivos nesta componente e encontram-se, consideravelmente, separadas umas das outras. Como se pode observar na Figura 4.18 (b), a aplicação do método PCA aos três sistemas referidos demonstra que as observações apresentam uma expressividade de 56% da variabilidade dos dados no sentido crescente dos valores da Comp.1. Metade das observações que incluem o azeite puro (1\_A) e que contêm maior quantidade de azeite (0,8\_A e 0,6\_A) possui valores positivos nesta componente, enquanto a outra metade com menor quantidade de azeite (0,4\_A e 0,2\_A) e com apenas óleo (0\_A) é caracterizada com valores negativos. A Comp.2 apresenta uma variância de 20,41% que representa uma fraca expressividade dos dados

nesta componente.

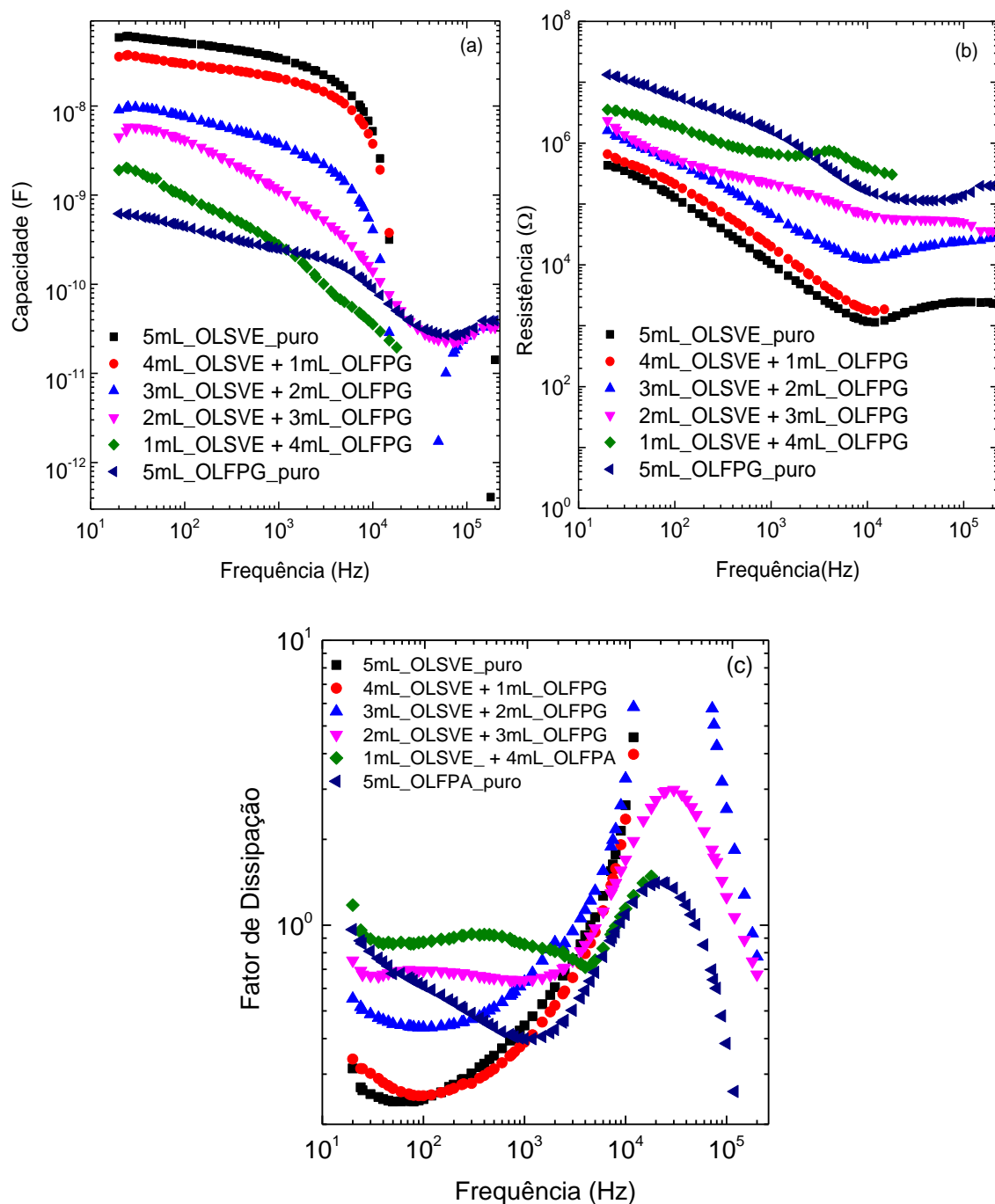


## 4.5.2 Análise de OLSVE adulterado com OLFPG

### 4.5.2.1 Análise com o sensor sem camada sensorial

Na Figura 4.19 apresentam-se os espectros de capacidade, de resistência e de fator de dissipação em função da frequência de OLSVE adulterado com OLFPG. As condições de análise e de temperatura (25°C) neste sistema foram as mesmas que às realizadas na adulteração de OLSVE misturado com OLFPa. Os resultados obtidos são semelhantes nos dois sistemas, pois o sensor detetou mais uma vez a presença de um óleo, mas neste caso foi o OLFPG. Os espectros mostram uma diminuição dos valores da capacidade que apenas apresenta irregularidades tanto na capacidade como na resistência nas amostras de 1mL\_ OLSVE + 4mL\_ OLFPG e 5mL\_ OLFPG\_puro. O comportamento da resistência prevalece, isto é, mostra-se crescente à medida que se aumenta OLFPG no OLSVE. O fator de dissipação é muito irregular e não mostra um comportamento coerente e as possíveis razões foram descritas no estudo da reprodutibilidade.

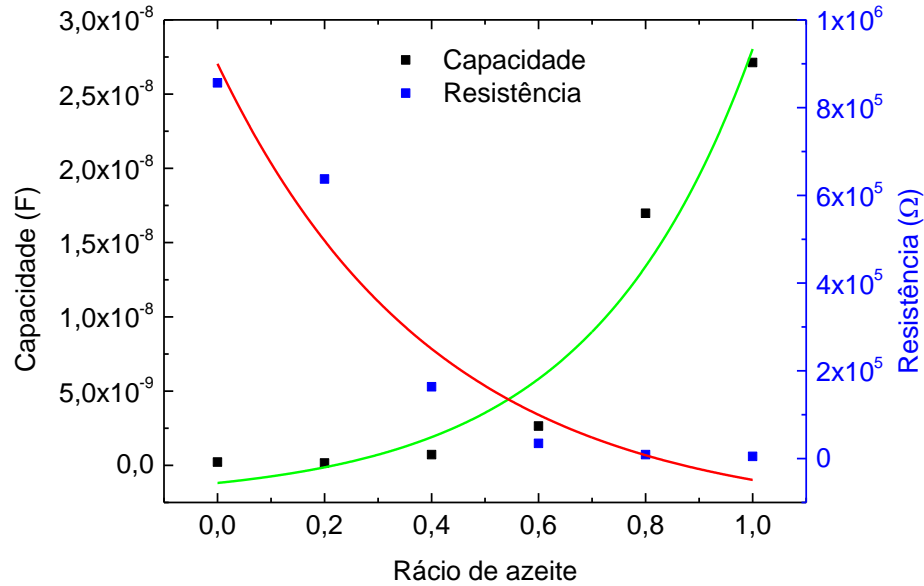
Comparativamente aos resultados obtidos no ensaio de OLSVE adulterado com OLFPa com o sensor sem camada sensorial, percebe-se que nesta mistura há uma maior separação entre o rácio de azeite que se exprime numa maior diferença de valores de impedância na capacidade e na resistência. Este resultado deve-se, provavelmente, à composição dos dois óleos usados na adulteração.



**Figura 4.19:** Espectros de (a) capacidade, (b) resistência e (c) fator de dissipação do OLSVE adulterado com OLFGP com o sensor sem camada sensorial, obtidos por espectroscopia de impedância.

Tal como no ensaio de OLSVE misturado com OLFGP com o sensor composto apenas pelos elétrodos interdigitados, voltou a verificar-se que o sensor indica uma resposta elétrica equivalente à frequência de  $2 \times 10^3$  Hz e na sua vizinhança para o rácio de azeite considerado. Assim, investigou-se uma vez mais este valor de frequência para uma adulteração diferente, tendo sido

verificado que a função que melhor se ajusta a capacidade e a resistência é uma função exponencial do tipo ( $y = A_1 \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + y_0$ ), tal como no sistema sem filme da mistura de OLSVE com OLFGA. Como se pode comprovar pela Figura 4.20, o parâmetro capacidade aumenta, enquanto a resistência diminui com o rácio de azeite. Neste caso, o ajuste de capacidade descreve melhor os resultados com  $R^2 = 0,93$ , indicado na Tabela 4.7.



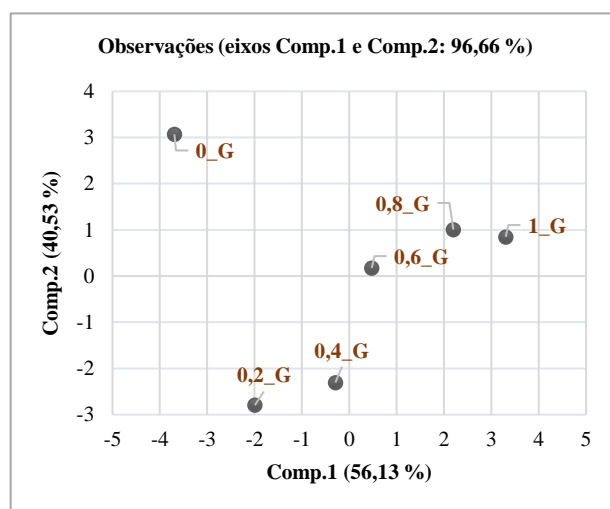
**Figura 4.20:** Dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFGA para a frequência fixa de  $2 \times 10^3$  Hz. O sensor não se encontrava revestido com filmes finos. As linhas a verde e vermelho correspondem aos ajustes por funções exponenciais da curva de capacidade e de resistência, respetivamente.

**Tabela 4.7:** Parâmetros dos ajustes exponenciais da dependência da capacidade e da resistência com o rácio de azeite de OLSVE misturado com OLFGA com sensor sem camada sensorial.

Espetros	Ajustes	Parâmetros	Valores dos parâmetros	$R^2$
Resistência	$y = A_1 \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + y_0$	$y_0$	$-1,3 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$	0,91
		$A_1$	$1 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^5$	
		$t_1$	$0,4 \pm 0,2$	
Capacidade	$y = A_1 \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + y_0$	$y_0$	$-2,3 \times 10^{-9} \pm 3,4 \times 10^{-9}$	0,93
		$A_1$	$1,1 \times 10^{-9} \pm 1,4 \times 10^{-9}$	
		$t_1$	$-0,3 \pm 0,1$	

#### 4.5.2.2 Análise pelo método PCA

A Figura 4.21 representa a aplicação da técnica PCA na mistura de OLSVE com OLFPG. A extração das variáveis baseou-se nos mesmos critérios descritos na Tabela 4.3. A Comp.1 descreve 56,13% da variabilidade dos dados e o seu percurso no sentido dos valores crescentes demonstra que as amostras distribuem-se desde a ausência de azeite, passando pelas misturas com maior quantidade de óleo, até o azeite puro. Nesta componente, a PCA separou com eficiência metade das amostras que contêm maior quantidade de azeite (1\_G; 0,8\_G e 0,6\_G) da outra metade composta com menor quantidade de azeite e com apenas óleo (0,4\_G; 0,2\_G e 0\_G). Relativamente à Comp.2, apesar de não demonstrar uma relação óbvia entre esta e as amostras, verifica-se que a variância explicada por esta componente apresenta um valor considerável de 40,53% e, portanto, contém informação que não pode ser desprezada. O gráfico mostra que o OLFPG (0\_G) possui valores positivos nesta componente.



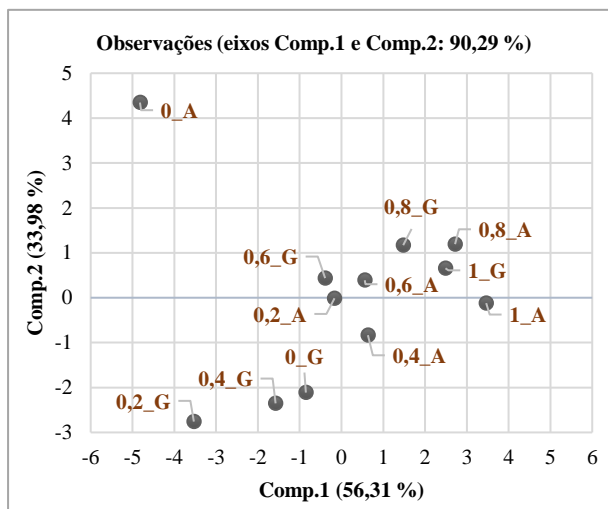
**Figura 4.21:** Representação gráfica que mostra a relação entre o rácio de azeite (1\_G; 0,8\_G; 0,6\_G; 0,4\_G; 0,2\_G e 0\_G) e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam 96,66% da variância total dos dados. Este resultado refere-se ao ensaio de OLSVE misturado com OLFPG com o sensor sem filme.

#### 4.5.3 Comparação de misturas

Para melhor investigar as semelhanças ou as diferenças nas diversas misturas, aplicou-se a PCA nos intervalos dos dados adquiridos por espectroscopia de impedância, de onde foram extraídas as variáveis seleccionadas. Os sistemas incluem a mistura de OLSVE com os óleos OLFPa e OLFPg com o sensor sem adsorção de filmes. Os resultados do gráfico da Figura 4.22 demonstram uma relação aceitável entre a Comp.1 e o rácio de azeite que apresenta 56,31% da variabilidade total dos dados. Excetuando a amostra de 3mL\_OLSVE + 2mL\_OLFPg (0,6\_G), que possui valores negativos, verifica-se que a PCA tem tendência a agrupar metade das observações com



maior quantidade de azeite com valores positivos na Comp.1. Por outro lado, metade das amostras com maior quantidade de óleo, excluindo o 2mL\_OLSVE + 3mL\_OLFPA (0,4\_A) fica com valores negativos nesta componente. A Comp.2 explica 33,98% da variação total dos dados contendo, assim, informação importante. Nesta componente, o 5mL\_OLFPA (0\_A) possui valores elevados e metade das amostras da mistura do OLSVE com OLFPG com maior quantidade de óleo e com apenas óleo (0,4\_A; 0,2\_A e 0\_A) possui valores negativos nesta componente, enquanto a outra metade (1\_A; 0,8\_A e 0,6\_A), apenas valores positivos.



**Figura 4.22:** Representação gráfica da relação entre as misturas de OLSVE com os óleos (OLFPA e OLFPG) sem adsorção de filmes finos nos elétrodo e as componentes principais (Comp.1 e Comp.2) que em conjunto explicam 90,29 % da variância total dos dados.

#### 4.6 Comentário final

Inicialmente, os diferentes tipos de azeite foram caracterizados por métodos convencionais, nomeadamente, a UV-Vis e a GC-MS. A informação recolhida por UV-Vis demonstrou que os azeites pertencentes ao grupo AVE possuem compostos que melhor absorvem a radiação eletromagnética, enquanto os ARV mostram bandas de absorção com valores mais baixos na gama de comprimentos de onda considerados. Através da GC-MS, os compostos com atributos positivos, tais como o 2-hexenal, 2-nonenal, benzaldeído, 1-penten-3-ona, pentanol, 1-hexanol e o 3-hexen-1-ol atribuem características frutadas e aroma verde aos azeites, especialmente, aos azeites de categoria virgem extra. No entanto, outros compostos detetados são responsáveis por atributos sensoriais negativos no azeite, como são os casos de 1-octeno, acetato de etilo e de vários aldeídos. Os ácidos identificados demonstraram que houve modificações significativas das amostras porque estes compostos aparecem no final do processo oxidativo.

As primeiras medições realizadas por espectroscopia de impedância consistiram na avaliação da reprodutibilidade do sensor interdigitado e dos efeitos da temperatura nas medições de impedância. O impulso foi do tipo sinusoidal com uma amplitude de 1 V. O estudo da reprodutibilidade baseou-se na avaliação das amostras de GLSVE e GLCLVE com os elétrodos sem revestimento de filmes finos, a temperatura de 25 °C. No caso do estudo dos efeitos da temperatura nas medições de impedância, constatou-se que a temperatura foi uma perturbação do sistema, tendo sido verificado que a capacidade decresce, enquanto a resistência cresce com o aumento da temperatura. Este comportamento sucedeu para valores de frequência a partir dos  $6 \times 10^2$  Hz para a capacidade e dos  $3 \times 10^3$  Hz para a resistência. O fator de dissipação cresceu gradualmente à medida que a temperatura aumentou.

Os diferentes tipos de azeite foram distinguidos por espectroscopia de impedância e os resultados demonstraram que os azeites com qualidade AVE apresentavam valores maiores de capacidade e verificou-se um resultado inverso na resistência. Por outro lado, o comportamento dos ARV é oposto ao referido. Com a aplicação do método estatístico multivariado PCA, foi possível agrupar as categorias de azeite, separando o conjunto de AVE no terceiro quadrante, os de ARV no segundo quadrante e os óleos (OLFPA eOLFPG) no quarto quadrante com a variabilidade total dos dados experimentais 82,20%.

No caso da análise da caracterização elétrica de adulteração de OLSVE com os óleosOLFPA eOLFPG com o sensor sem revestimento de polieletrólitos, constatou-se que o sensor apresentava uma boa relação entre o rácio de azeite e as medições de impedância. Assim, na tentativa de aumentar a sensibilidade do sensor na distinção das misturas de OLSVE com oOLFPA, foram adsorvidos sobre o substrato de vidro e pelos elétrodos interdigitados de ouro combinações de (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e (PAH/GO)<sub>5</sub>, pela técnica de construção de camadas LbL. O sistema que apresentou maior diferença de impedância, entre o rácio de azeite e as medições de impedância, é constituído pelo sensor interdigitado de ouro e, igualmente, por um sensor interdigitado do mesmo género, mas com cinco bicamadas de (PAH/PAZO)<sub>5</sub>.

Os espectros dos dois ensaios correspondentes ao OLSVE misturado com os óleos de amendoim e girassol com elétrodos interdigitados sem filme, apresentaram comportamentos elétricos semelhantes a frequência de  $2 \times 10^3$  Hz. Nestes dois sistemas, a capacidade e a resistência podem ser descritas por funções exponenciais com o OLSVE misturado comOLFPG a apresentar melhores valores do coeficiente de determinação, nomeadamente,  $R^2 = 0,93$  para a capacidade e  $R^2 = 0,91$  para a resistência. O sistema sem filme para a deteção doOLFPA em OLSVE apresentou valores que indicaram uma dependência menor da capacidade para valores de frequência mais baixos. O fator de dissipação não demonstrou um comportamento evidente nos diferentes ensaios

e este resultado poderá ter sido originado por alguma alteração do teor de humidade das amostras, por algum tipo de agitação mecânica que tenha afetado os contactos eléctricos entre a sonda e o analisador, pela composição do azeite e no caso dos sistemas com filmes poderá ser incluído a não uniformidade dos mesmos. Devido à relativa fragilidade do sistema de medição, sobretudo, em manter a temperatura constante durante as medições, mas também à inferior sofisticação do analisador face a alguns aparelhos modernos e com maior precisão, a aquisição exigiu várias repetições e os dados necessitaram do cálculo da média dos dados adquiridos.

Dos diferentes sistemas referidos anteriormente, resultaram um conjunto de dados que foram utilizados para extrair variáveis para a análise de PCA. Para este efeito, foram seleccionadas variáveis nos resultados de impedância dos dados experimentais que melhor apresentaram uma relação entre o rácio de azeite e a capacidade e resistência. No sistema de OLSVE misturado comOLFPA sem filme, a PCA separou com eficácia as duas primeiras observações com maior quantidade de azeite das restantes. Ao incluir as variáveis dos sistemas (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e (PAH/GO)<sub>5</sub> nas do sistema sem filme, obteve-se um resultado com características diferentes. Isto porque, houve uma separação de metade das observações com maior quantidade de azeite da outra metade com menor quantidade de azeite. Esta característica foi verificada também na comparação de adulteração de OLSVE comOLFPA eOLFPG com o sensor sem polímeros, cuja variabilidade total dos dados experimentais foi de 90,29%.

Os resultados demonstraram que a LE construída baseada na espectroscopia de impedância foi eficaz quer na classificação de azeite, quer na discriminação de azeite adulterado para o rácio de azeite considerado.





## Conclusões e Perspetivas Futuras

### 5.1 Conclusões

Com o presente trabalho, estudou-se a possibilidade de uma LE baseada no método de espectroscopia de impedância para classificar diferentes tipos de azeite de marcas Portuguesas que conforme o rótulo pertencem às categorias de AVE (OLSVE, GLCLVE, GLSUVE) e ARV (OLSRV, GLSBRV e SOSPBRV) e de discriminar azeite adulterado com óleos de qualidade inferior (OLFPA eOLFPG). Num primeiro momento, efetuou-se a análise por UV-Vis que permitiu caraterizar os azeites e os resultados obtidos demonstraram que, apesar das semelhanças entre os espectros adquiridos, os AVE apresentaram valores de absorção da radiação eletromagnética superiores. Este resultado foi evidenciado no azeite da marca OLSVE. Por outro lado, os ARV apresentaram valores de absorção inferiores. Outra metodologia utilizada foi a GC-MS, em que os compostos voláteis dos azeites identificados por meio desta técnica foram classificados de acordo com estudos sensoriais disponíveis na literatura. Os perfis revelaram diferentes compostos que caraterizaram cada azeite e destaca-se o 2-hexenal por atribuir caraterísticas verdes e frutadas aos mesmos e apresenta picos mais intensos nos AVE do que nos ARV.

A análise dos azeites por espectroscopia de impedância com os sensores interdigitados de ouro sem filme mostrou que o grupo AVE contém valores de capacidade superiores, enquanto o grupo dos ARV possui valores inferiores. A aplicação da técnica PCA a um conjunto de dados obtidos por UV-Vis, GC-MS e por espectroscopia de impedância permitiu melhorar a discriminação dos azeites, separando com eficiência os AVE (terceiro quadrante), os ARV (segundo quadrante) e os óleos (quarto quadrante) em que as duas componentes discriminantes representaram uma variabilidade total dos dados experimentais de 82,20%.

A fim de avaliar a capacidade da LE em discriminar azeite adulterado, utilizou-se, primeiramente, um sistema que compreendeu apenas um sensor interdigitado sem a adsorção de filmes finos e os resultados demonstraram uma relação entre o rácio de azeite e a capacidade e resistência. Assim, nos sensores foram revestidos filmes finos de (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e (PAH/GO)<sub>5</sub> que atribuíram ao sensor características elétricas distintas. Apesar da irregularidade nos resultados de alguns ensaios, os espectros de capacidade e resistência adquiridos para os sistemas referidos demonstraram conformidades. Contudo, o fator de dissipação não demonstrou uma tendência evidente que se pressupõe ser atribuído à relativa fragilidade do sistema ou às alterações de humidade nas amostras.

Na análise de adulteração de OLSVE com OLFPa nos sistemas compreendidos pelo sensor sem filme e revestidos com (PAH/PAZO)<sub>5</sub> e (PAH/GO)<sub>5</sub>, verificou-se que os valores de capacidade elétrica são superiores no azeite puro e à medida que a quantidade de óleo aumentou nas misturas, os valores de resistência também aumentaram. Esta característica verificou-se, igualmente, na mistura de OLSVE com OLFPa. O tratamento estatístico dos resultados, através da aplicação da PCA permitiu diferenciar com maior eficácia as observações. Após a análise estatística da mistura de OLSVE com OLFPa sem filme, acrescentou-se ao sistema referido as variáveis dos outros dois ensaios com filmes. Os resultados obtidos por meio deste procedimento mostraram que a técnica PCA agrupou metade das observações que corresponde à maior quantidade de azeite com valores positivos e a outra metade com valores negativos na Comp.1 com uma variabilidade dos dados experimentais de 76,42%.

Os resultados obtidos pela LE permitiram demonstrar as potencialidades deste método e evidenciaram que os objetivos previamente propostos foram alcançados. Demonstra-se, assim, que a metodologia principal deste trabalho pode ser usada como uma técnica complementar na análise de amostras de azeite.

## **5.2 Perspetivas futuras**

Como foi referido ao longo da análise de resultados, o comportamento das medições de impedância de azeite demonstrou certas irregularidades e algumas tentativas de explicação das mesmas, são apenas suposições válidas, mas que requerem investigação. Neste sentido, a continuidade deste trabalho poderá começar pela construção de um porta amostra adequado para o sistema de medições, que vise reduzir a instabilidade entre os contatos do sensor e do analisador de impedância e que garanta com maior eficiência a temperatura constante durante as medições e sem aumento do teor de humidade nas amostras. Também seria interessante a análise de azeite do lagar que envolvesse um painel de provadores profissionais e por espectroscopia de impedância.

Neste caso, o sensor permaneceria suspenso sobre a amostra, isto é, o objetivo seria avaliar os compostos voláteis. Estes resultados poderiam ser relacionados com a outra análise dos compostos voláteis obtidos por GC-MS. Sugere-se, também, a investigação de novas camadas sensoriais, possivelmente, preparadas a partir de moléculas biológicas por forma a permitirem obter uma maior diferença de impedância entre a matriz complexa do azeite e as medições de impedância.





### 5.3 Trabalhos no âmbito da tese

- **Comunicação em painel**

Crisolita Pires, Gonçalo Carvalho, Gonçalo Magalhães Mota, M. Raposo, Paulo A. Ribeiro, " Analysis of Portuguese Olive Oils and Oil Mixtures with Impedance Spectroscopy", 2nd Workshop Heavy Metals: from the Environment to the Man, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica Portugal, 21-22 March, 2016

- **Dados e Tratamento de Dados**

"Impedance Spectroscopy a tool for Development of Sensors", Dados e Tratamento de dados para a apresentação oral convidada da Profª **M. Raposo**, Department of Physics, Faculty of Sciences, Moulay Ismaïl University, Meknes, Marrocos, 14 December 2015.

"A Morocco-Portugal Collaborative Project of Development of Electronic Tongues Prototypes to Analyse the Quality of Olive Oils :“Évaluation qualitative des huiles d’olives par combinaison d’une langue électronique hybride portable et des analyses chimiques basées sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)”, Dados e Tratamento de dados para a apresentação oral convidada da Profª **M. Raposo**, SOMMET CRUP PORTUGAL/CPU MAROC, Event organized by the Ministry of Science and Technology, Teatro Thália, Lisbon, 18 March, 2016.

- **Publicação em fase final de desenvolvimento**


Crisolita Pires, Gonçalo Carvalho, Nezha El Bari, Benachir Bouchikhi, Paulo A. Ribeiro and Maria Raposo, “Analysis of Portuguese Olive Oils and Oil Mixtures with Impedance Spectroscopy”, A ser submetido numa revista internacional.



## Anexos

### Fichas de segurança dos polieletrólitos

#### a) Ficha de segurança do PAZO

Símbolo: 

Significado: *Warning*

Código de perigo: H302\*\*

Equipamento de proteção pessoal: Máscara tipo N96 (US), óculos de proteção e luvas

Código Europeus de perigo: Xn<sup>††</sup>

Código Europeus de risco: 22<sup>#</sup>

Código Europeus de segurança: 36<sup>§§</sup>

#### b) Ficha de segurança do PAH

Símbolo: 

Significado: *Warning*

Código de Perigo: H302-H317\*\*\*

Equipamento de proteção pessoal: Máscara tipo N96 (US), óculos de proteção e luvas

Código Europeus de Perigo: Xn

Código Europeus de risco: 22-43<sup>†††</sup>

Código Europeus de segurança: 36/37<sup>###</sup>

#### c) Ficha de segurança do GO

Não é um composto tóxico, no entanto, recomenda-se o uso de equipamento de proteção, tais como luvas, batas e óculos.

---

\*\* Perigoso se ingerido; toxicidade oral aguda.

†† Perigoso.

# Perigoso de engolido.

§§ Utilizar roupa de proteção adequada.

\*\*\* Pode provocar uma reação alérgica na pele.

††† Pode causar sensibilidade em contato com a pele.

### Irritante para os olhos e para o sistema respiratório; utilizar roupa de proteção adequada e luvas.



## Bibliografia

- [1] C. Delgado and J. X. Guinard, “How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings?,” *Food Qual. Prefer.*, vol. 22, no. 2, pp. 213–225, 2011.
- [2] P. Reboredo-Rodríguez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, G. Fregapane, M. D. Salvador, and J. Simal-Gándara, “Characterisation of extra virgin olive oils from Galician autochthonous varieties and their co-crushings with Arbequina and Picual cv.,” *Food Chem.*, vol. 176, pp. 493–503, 2015.
- [3] R. W. Owen, a Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, G. Würtele, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, “Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants,” *Lancet Oncol.*, vol. 1, pp. 107–112, 2000.
- [4] C. D. Calvano, C. De Ceglie, L. D’Accolti, and C. G. Zambonin, “MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent,” *Food Chem.*, vol. 134, no. 2, pp. 1192–1198, 2012.
- [5] E. Borràs, M. Mestres, L. Aceña, O. Busto, J. Ferré, R. Boqué, and A. Calvo, “Identification of olive oil sensory defects by multivariate analysis of mid infrared spectra,” *Food Chem.*, vol. 187, pp. 197–203, 2015.
- [6] P. Dais and E. Hatzakis, “Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 765, pp. 1–27, 2013.
- [7] R. Garrido-Delgado, M. D. M. Dobao-Prieto, L. Arce, and M. Valcárcel, “Determination of volatile compounds by GC-IMS to assign the quality of virgin olive oil,” *Food Chem.*, vol. 187, pp. 572–579, 2015.
- [8] K. Wójcicki, I. Khmelinskii, M. Sikorski, F. Caponio, V. M. Paradiso, C. Summo, A. Pasqualone, and E. Sikorska, “Spectroscopic techniques and chemometrics in analysis of blends of extra virgin with refined and mild deodorized olive oils,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 117, no. 1, pp. 92–102, 2015.
- [9] H. Lizhi, K. Toyoda, and I. Ihara, “Discrimination of olive oil adulterated with vegetable oils using dielectric spectroscopy,” *J. Food Eng.*, vol. 96, no. 2, pp. 167–171, 2010.
- [10] I. Mirela and C. Apetrei, “Voltammetric e-tongue for the quantification of total polyphenol content in olive oils,” *FRIN*, vol. 54, no. 2, pp. 2075–2082, 2013.
- [11] N. Ali, E. Chapuis, J. Tavoillot, and T. Mateille, “Plant-parasitic nematodes associated with olive tree (*Olea europaea* L.) with a focus on the Mediterranean Basin: A review,” *C. R. Biol.*, vol. 337, no. 7–8, pp. 423–442, 2014.
- [12] G. Nieto Feliner, “Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean

- Basin. A review,” *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, vol. 16, no. 5, pp. 265–278, 2014.
- [13] C. Amaral, “Caraterização físico-química e microbiológica de águas residuais de lagares de azeite: Seleção de leveduras para aplicação ao tratamento de águas ruças,” Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2009.
- [14] M. N. Criado, M. J. Motilva, M. Goñi, and M. P. Romero, “Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars,” *Food Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 748–755, 2007.
- [15] F. Nogueira, “Contribuição para a caracterização de azeitonas de mesa mistas ao natural produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos,” Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, 2012.
- [16] J. Ramalheiro, “Contribuição para a caraterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades,” Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, 2009.
- [17] A. Garcia, “Enrelvamento no olival – Efeito da rega no crescimento vegetativo, na produção e na qualidade do azeite,” Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, 2011.
- [18] Z. Jorge, “Análise sensorial, consumo e Qualidade de Azeites de Oliva Virgem Extra,” Tese de Pós-Graduação, Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- [19] M. T. Morales, G. Luna, and R. Aparicio, “Comparative study of virgin olive oil sensory defects,” *Food Chem.*, vol. 91, no. 2, pp. 293–301, 2005.
- [20] Conselho da União Europeia, “Regulamento (CE) n° 1234/2007,” vol. 50, 2007.
- [21] M. Bengana, A. Bakhouch, J. Lozano-Sánchez, Y. Amir, A. Youyou, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, “Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil,” *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 2, pp. 1868–1875, 2013.
- [22] A. Alves, “Técnicas analíticas de controlo de qualidade de azeites,” Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Tomar, 2013.
- [23] P. Carapinha, “Utilização do azeite na fritura de alimentos,” Tese de Mestrado, Univeridade Técnica de Lisboa, Instituto de Agronomia, Lisboa, 2012.
- [24] “International Olive Council: Olive Growing a Time-Revered Tadition.” Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/>. [Acedido em: 02-Fevereiro-2016].
- [25] T. Cecchi, P. Passamonti, and P. Cecchi, “Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger,” *Food Chem.*, vol. 120, no. 3, pp. 730–735, 2010.
- [26] G. Pristouri, a. Badeka, and M. G. Kontominas, “Effect of packaging material headspace,

- oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil,” *Food Control*, vol. 21, no. 4, pp. 412–418, 2010.
- [27] R. Garcia, N. Martins, and M. J. Cabrita, “Putative markers of adulteration of extra virgin olive oil with refined olive oil: Prospects and limitations,” *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 2, pp. 2039–2044, 2013.
- [28] Deco Proteste, “Azeite virgem extra?,” *366 Proteste*, 2015.
- [29] Á. A. Almario and R. L. T. Cáceres, “Electronic Tongue and Neural Networks , Biologically Inspired Systems Applied to Classifying Coffee Samples,” *Anal. Chem.*, pp. 266–274, 2014.
- [30] D. Ha, Q. Sun, K. Su, H. Wan, H. Li, N. Xu, F. Sun, L. Zhuang, N. Hu, and P. Wang, “Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 207, pp. 1136–1146, Feb. 2015.
- [31] L. a. Dias, a. M. Peres, a. C. a Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-Boas, and a. a S. C. Machado, “An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 136, pp. 209–217, 2009.
- [32] I. Campos, M. Alcañiz, D. Aguado, R. Barat, J. Ferrer, L. Gil, M. Marrakchi, R. Martínez-Mañez, J. Soto, and J.-L. Vivancos, “A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants.,” *Water Res.*, vol. 46, no. 8, pp. 2605–14, May 2012.
- [33] Z. Wei, J. Wang, and X. Zhang, “Monitoring of quality and storage time of unsealed pasteurized milk by voltammetric electronic tongue,” *Electrochim. Acta*, vol. 88, pp. 231–239, 2013.
- [34] Z. Haddi, H. Alami, N. El Bari, M. Tounsi, H. Barhoumi, a. Maaref, N. Jaffrezic-Renault, and B. Bouchikhi, “Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles,” *Food Res. Int.*, vol. 54, pp. 1488–1498, 2013.
- [35] I. M. Apetrei and C. Apetrei, “Detection of virgin olive oil adulteration using a voltammetric e-tongue,” *Comput. Electron. Agric.*, vol. 108, pp. 148–154, 2014.
- [36] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winqvist, and I. Lundström, “Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 426, pp. 217–226, 2001.
- [37] H. Lizhi, K. Toyoda, and I. Ihara, “Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency , temperature , moisture and composition,” *J. Food Eng.*, vol. 88, pp. 151–158, 2008.
- [38] R. Pimentel, “Desenvolvimento de um sensor de ibuprofeno em meio aquoso,” Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Caparica, 2014.
- [39] V. Tsouti, C. Boutopoulos, I. Zergioti, and S. Chatzandroulis, “Capacitive microsystems for biological sensing,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–11, 2011.

- [40] K. Chetpattananondh, T. Tapoanoi, P. Phukpattaranont, and N. Jindapetch, “A self-calibration water level measurement using an interdigital capacitive sensor,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 209, pp. 175–182, 2014.
- [41] D. L. Chinaglia and G. Gozzi, “Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino,” *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 4504, no. 2008, 2009.
- [42] J. M. Moita Neto and G. C. Moita, “Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados,” *Quim. Nova*, vol. 21, no. 4, pp. 467–469, 1998.
- [43] J. EDWARD JACKSON, *A User’s Guide to Principal Components*. Wiley, 2003.
- [44] Q. Alexandra, “Estudo da formação de filmes nanoestruturados para aplicação em fotônica,” Tese de Doutorado, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Caparica, 2007.
- [45] D. Alves, “Estudo e Aplicacoes de Nanomateriais Multifuncionais: Propriedades de Transporte de Nanotubos de Titanato e Novos Materiais Baseados em Oxido de Grafeno,” Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de Doutorado, 2013.
- [46] J. Silva, “Microscopia De Força Elétrica Em Amostra De Óxido De Grafeno,” Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 2013.
- [47] V. Meriga, S. Valligatla, S. Sundaresan, C. Cahill, V. R. Dhanak, and A. K. Chakraborty, “Optical, electrical, and electrochemical properties of graphene based water soluble polyaniline composites,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 45, pp. 1–9, 2015.
- [48] A. Monteiro, “Estudo da dinâmica da criação e da relaxação de birrefringência fotoinduzida em filmes automontados de PAH/PAZO,” Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2013.
- [49] Y. Guo, L. Yang, D. Wang, S. Liu, and S. Zhang, “Preparation and nanotribological properties of polyelectrolyte multilayers with in situ Au nanoparticles,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 88, pp. 164–171, 2015.
- [50] O. Oliveira Jr, M. Raposo, and A. Dhanabalan, *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*. H.S. Nalwa, 2001.
- [51] “Agilent Technologies: An introduction to Bio-Analytical Measurement.” Disponível em: [http://www.agilent.com/labs/features/2011\\_101\\_bio.html](http://www.agilent.com/labs/features/2011_101_bio.html). [Acedido em: 19-Abril-2016].
- [52] A. Ferreira, “Potencial de plantas estuarinas na remediação de produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal,” Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2014.
- [53] J. M. A. Araújo, *Química de Alimentos*, 3ª ed. UFV, 2004.
- [54] T. Custódio, “Azeites extra-virgem: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade,” Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, 2009.



- [55] A. Valente and F. Augusto, “Microextração por fase sólida,” *Quim. Nova*, vol. 23, pp. 523–530, 2000.
- [56] I. Romero, D. L. García-González, R. Aparicio-Ruiz, and M. T. Morales, “Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects,” *Talanta*, vol. 134, pp. 394–401, 2015.